

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/31125
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Juni 2000 (02.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE99/03732	(81) Bestimmungsstaaten:	AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum:	19. November 1999 (19.11.99)		
(30) Prioritätsdaten:	198 54 672.6 26. November 1998 (26.11.98) DE 198 56 301.9 7. Dezember 1998 (07.12.98) DE		
(71)(72) Anmelder und Erfinder:	KRAMER, Michael, D. [DE/DE]; Bergstrasse 85, D-64319 Pfungstadt (DE).		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	BECHTEL, Michael [DE/DE]; Edelsteinstrasse, D-69198 Schriesheim (DE). REINARTZ, Jeanette [DE/DE]; Angelweg 2, D-69121 Heidelberg (DE). SCHÄFER, Birgit [DE/DE]; Oden- waldstrasse 49/2, D-69124 Heidelberg (DE). WALLICH, Reinhard [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 52/1, D-69118 Heidelberg (DE).		Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
(74) Anwalt:	RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, D-69198 Schriesheim (DE).		

(54) Title: REGULATORY PROTEIN pKe#83 FROM HUMAN KERATINOCYTES

(54) Bezeichnung: REGULATORISCHES PROTEIN pKe#83 AUS HUMANEN KERATINOZYTEN

(57) Abstract

The invention relates to an isolated polypeptide which is the same as or similar to (i.e. has the same function and effect as) a protein which occurs naturally in human keratinocytes and is more strongly expressed when the keratinocytes are in their activated state. The invention also relates to an isolated nucleic acid which codes a polypeptide or protein of this type that is typical for human keratinocytes and to the use of said polypeptide and said nucleic acid for detection, especially diagnostic purposes and/or for therapeutic purposes or the use of reagents, especially recombinant vector molecules and antibodies, against molecules of this type. The inventive protein has the amino acid sequence shown in sequence protocol SEQ ID NO:3 or an allele or derivative of this amino acid sequence produced therefrom by amino acid substitution, deletion, insertion, or inversion, and the inventive nucleic acid has either the amino acid sequence shown in sequence protocol SEQ ID NO: 1 or a nucleotide sequence complementary thereto or a partial sequence of one of these two nucleotide sequences or a nucleotide sequence which is completely or partially hybridizable one of these two nucleotide sequences.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke bzw. die Verwendung von Reagenzien, insbesondere rekombinanten Vektormolekülen und Antikörpern, gegen solche Moleküle. Das erfindungsgemäße Protein weist die im Sequenzprotokoll SEQ' ID NO:3 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz auf, und die erfindungsgemäße Nukleinsäure weist entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierenden Nukleotidsequenz auf.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschhan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Regulatorisches Protein pKe#83 aus humanen Keratinozyten

B e s c h r e i b u n g

5 Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert,

10 sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke, und Reagenzien, die unter Verwendung wenigstens eines dieser Moleküle hergestellt sind, insbesondere rekombinante Vektormoleküle und Antikörper.

15 Nach dem gegenwärtigen Stand der Technik werden in der Dermatotherapie zur Beeinflussung epidermaler Störungen wie z.B. der Autoimmundermatosen "Pemphigus vulgaris" und "Bullöses Pemphigoid" im wesentlichen Medikamente mit breitem Wirkungsspektrum eingesetzt,

20 insbesondere lokal bzw. systemisch applizierte Glukokortikoide, Vitamin-A-Säure-Derivate, Antimetabolite und Zytostatika, oder es wird mit mehr oder weniger unspezifischen Maßnahmen, wie z.B. der sog. "Farbstofftherapie" oder der "Lichttherapie", behandelt. Die bekannten Wirkstoffe bzw. Maßnahmen haben jedoch allesamt den Nachteil, daß sie wenig spezifisch

25 sind und damit naturgemäß zahlreiche Nebenwirkungen hervorrufen.

Die Bereitstellung spezifischerer Wirkstoffe scheiterte bislang an dem in der Dermatologie seit langem bestehenden grundsätzlichen Problem, daß die Zahl der zellulären Zielmoleküle, im folgenden allgemein als Zielstrukturen

30 ("Targets") benannt, die als Angriffspunkt für eine (spezifische)

Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels - insbesondere unter medizinischen oder auch kosmetischen Gesichtspunkten - dienen könnten, in epidermalen Keratinozyten eng begrenzt ist.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, neue Zielstrukturen in epidermalen Keratinozyten bereitzustellen, die als Angriffspunkt für Diagnostika, Therapeutika, Kosmetika oder allgemein für die Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels dienen können.
- 10 Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Polypeptids bzw. Proteins der eingangs genannten Art, das bei aktivierten Keratinozyten aufreguliert, d.h. vermehrt exprimiert bzw. produziert und auf einem höheren Konzentrationsspiegel gehalten wird, und das die im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 3** oder **SEQ ID NO: 4** oder **SEQ ID NO: 6** oder
- 15 **SEQ ID NO: 8** dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz aufweist. Das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO: 3** oder **SEQ ID NO: 4** oder **SEQ ID NO: 6** oder **SEQ ID NO: 8** wird im folgenden
- 20 auch mit Protein "pKe#83" bezeichnet.

Eine weitere Lösung der genannten Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer isolierten Nukleinsäure, die ein Protein kodiert, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im 25 aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist, und die entweder die im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** oder die im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 7** dargestellte Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit 30 einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz

aufweist, wobei in diesen Sequenzprotokollen **SEQ ID NO: 1** und **SEQ ID NO: 7** anstelle von "T" auch "U" stehen kann. Zu dieser erfindungsgemäßen Gruppe von Nukleinsäuren bzw. Nukleotidsequenzen gehören insbesondere auch Splice-Varianten (z.B. **SEQ ID NO: 2** oder **SEQ ID NO: 5**) und Sense- oder Antisense-Oligonukleotide, die mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** oder mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 7** dargestellten Nukleotidsequenz hybridisieren, vorzugsweise identisch mit bzw. (partiell) komplementär zu dieser sind. Zwei bevorzugte Splice-Varianten der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO: 1** und **SEQ ID NO: 7** sind in den Sequenzprotokollen **SEQ ID NO: 2** und **SEQ ID NO: 5** dargestellt.

Die Erfindung umfaßt infolgedessen auch Proteine bzw. Polypeptide der eingangs genannten Art, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, welche aus einer solchen Splice-Variante resultiert, insbesondere aus der Splice-Variante einer mRNA, die mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** oder mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 7** angegebenen Nukleotidsequenz identisch oder ganz oder teilweise komplementär dazu ist.

20 Die erfindungsgemäßen Sense- und Antisense-Oligonukleotide umfassen jeweils mindestens 6, vorzugsweise 8 - 25 Nukleotide.

Der Begriff "hybridisiert" bezieht sich auf die im Stand der Technik bekannten Hybridisierungsverfahren unter üblichen, insbesondere unter 25 hoch stringenten Hybridisierungsbedingungen. Die konkreten Hybridisierungsparameter wählt der Fachmann anhand der eingesetzten Nukleotidsequenz und seines allgemeinen Fachwissens (vgl.: *Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons Inc., Suppl. 37, Chapter 4.9.14*).

Neben den in den Sequenzprotokollen **SEQ ID NO: 1**, **SEQ ID NO: 7**, **SEQ ID NO: 2** und **SEQ ID NO: 5** gezeigten Nukleotidsequenzen und den diesen Sequenzen im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenzen umfaßt die vorliegende Erfindung auch
5 solche Nukleotidsequenzen, die damit unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Der Begriff "hybridisieren" bzw. "Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird wie bei *Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989, 1.101 bis 1.104* verwendet. Demnach spricht man von einer Hybridisierung unter
10 stringenten Bedingungen, wenn nach Waschen für eine Stunde mit 1 x SSC und 0,1% SDS, vorzugsweise mit niedriger konzentriertem SSC, insbesondere 0,2 x SSC, bei einer Temperatur von wenigstens 55°C, vorzugsweise 62°C und besonders bevorzugt 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Jede Nukleotidsequenz, die unter
15 derartigen Waschbedingungen mit einer Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO: 1**, **SEQ ID NO: 7**, **SEQ ID NO: 2** oder **SEQ ID NO: 5** oder mit einer der Sequenz gemäß **SEQ ID NO: 1** oder **SEQ ID NO: 7** oder **SEQ ID NO: 2** oder **SEQ ID NO: 5** im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz hybridisiert, gehört zum Gegenstand der
20 vorliegenden Erfindung.

Die erfindungsgemäß(en) Nukleinsäure(n) kann (können) sowohl aus einer natürlichen Quelle als auch synthetisch oder halbsynthetisch gewonnen werden. In der Praxis hat sich besonders die Ausführung als cDNA bewährt.

25

Das Polypeptid, das die Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO: 3** bzw. **SEQ ID NO: 8** aufweist und von der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** bzw. **SEQ ID NO: 7** dargestellten Nukleinsäure kodiert wird, und das im folgenden als Protein "pKe#83" bezeichnet ist, wird in humanen epidermalen
30 Keratinozyten aufreguliert, nämlich verstärkt exprimiert (produziert) und auf

einem im Vergleich zum Ausgangszustand signifikant höheren Konzentrationsspiegel gehalten, wenn sich diese Zellen im "aktivierten" Zustand befinden, d.h. unter anderem im Zustand der Proliferation und/oder Migration, z.B. nach einer unfallbedingten Hautverletzung oder bei den 5 autoimmunologisch ausgelösten bullösen Dermatosen "Pemphigus vulgaris" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Desmosomen) und "Bullöses Pemphigoid" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Hemidesmosomen). Der aktivierte Zustand der humanen epidermalen Keratinozyten äußert sich auch in einer im Vergleich zum Ruhezustand (Ausgangszustand) erhöhten 10 Expression der bekannten Aktivierungsmarker uPA (Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und uPA-R (Rezeptor für Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und kann anhand dieser Marker qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden (vgl.: Schäfer, et al., 1996: *Dispase-mediated basal detachment of cultured keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87)*, *Exp. Cell Res.* 15 228, pp. 246 - 253).

Das Protein pKe#83 weist eine sog. Prenyl-Gruppen-Bindungsstelle ("CAAX Box") auf. Hierbei handelt es sich um eine Bindungsstelle, die bei einer 20 Vielzahl eukaryontischer Proteine eine posttranskriptionelle Veränderung erlaubt, indem eine Farnesyl- oder eine Gerany-Geranyl-Gruppe an einen Cysteinrest angehängt wird, der drei Aminosäuren vom C-Terminus entfernt ist, und wobei die beiden am C-Terminus gelegenen Aminosäuren in der Regel aliphatisch sind. Ras Proteine und eine Vielzahl von G-Proteinen 25 weisen eine solche CAAX Box auf.

Zudem besitzt das Protein "pKe#83" eine Reihe putativer Phosphorylierungsstellen. Die genannten Motive weisen darauf hin, daß das Protein pKe#83 in Signaltransduktionsabläufe eingebunden ist.

Mit der (isolierten) Bereitstellung des Proteins "pKe#83", nämlich mit der Beschreibung von Nukleotidsequenzen, die dieses Protein kodieren, und mit der Angabe (einer) seiner Aminosäuresequenz(en) ist es möglich, den Stoffwechsel physiologisch aktiver bzw. aktivierter Keratinozyten - und 5 selbstverständlich auch anderer das Protein "pKe#83" exprimierender Zellen - gezielt zu beeinflussen, insbesondere zu Zwecken der medizinischen Therapie und kosmetischen Behandlung.

Die Erfindung betrifft desweiteren rekombinante DNS-Vektormoleküle, die 10 eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfassen, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#83, in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweisen. Bei diesen DNS-Vektormolekülen handelt 15 es sich vorzugsweise um Abkömmlinge des Plasmids pUEX-1 und/oder des Plasmids pGEX-2T und/oder des Plasmids pcDNA3.1, da sich diese Vektoren in der Praxis als sehr gut geeignet erwiesen haben. Besonders bevorzugt sind das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83 gemäß dem in Fig. 2 offenbarten Vektorprotokoll und das Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83- 20 FLAG gemäß dem in Fig. 3 offenbarten Vektorprotokoll. Als eukaryontische Zelle kommen insbesondere Zellen aus Zellkulturen, z.B. Cos-Zellen, in Betracht, ebenso gut kann die betreffende Zelle aber auch Bestandteil eines lebenden Organismus, z.B. einer transgenen Maus, sein.

25 Die Erfindung umfaßt deshalb auch transformierte Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, die mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in diesen Zellen natürlicherweise oder als Folge einer Rekombination enthalten ist, und die (infolgedessen) die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im 30 aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins "pKe#83", besitzen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder eines erfindungsgemäßen Vektormoleküls zur Herstellung transgener Säugetiere, insbesondere Mäuse oder Ratten.

5 Die erfindungsgemäßen Transfektanten ermöglichen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten zum Zweck der weitergehenden Aufklärung der durch das Protein "pKe#83" induzierten Veränderungen der Zellmorphologie und zellulären Basisfunktionen wie Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung, insbesondere im Hinblick auf die Beantwortung der Frage,
10 ob das Protein "pKe#83" selbst eine "pathogene" Aktivität besitzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins,
15 insbesondere des Proteins "pKe#83", wobei dieses Reagenz dadurch charakterisiert ist, daß es wenigstens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt. "Zum indirekten Nachweis" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß tatsächlich die das Protein kodierende mRNA direkt nachgewiesen wird - und somit das Protein nur indirekt (vermittels dieser mRNA).

20 Das Protein "pKe#83" und die damit, d.h. mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 3** oder mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 8** dargestellten Aminosäuresequenz verwandten Polypeptide, d.h. die Polypeptide, die durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Inversion
25 von der Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO: 3** oder gemäß **SEQ ID NO: 8** ableitbar sind oder die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die aus einer Splice-Variante einer mRNA resultiert, welche mit der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** oder gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 7** oder einer Teilsequenz davon identisch
30 oder komplementär dazu ist oder zumindest hybridisiert, bieten vielfältige

Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der dermatologischen Forschung und Entwicklung. Insbesondere können Antikörper gegen diese Polypeptide bzw. Proteine hergestellt werden, die dann mit entsprechender Modifikation entweder als Diagnostika oder als Therapeutika oder auch als Kosmetika 5 ("cosmeceuticals") einsetzbar sind.

Die Erfindung umfaßt folglich auch die Verwendung eines solchen Proteins bzw. Polypeptids zur Herstellung eines (monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpers gegen dieses Polypeptid, den besagten Antikörper selbst und 10 ebenso seine Verwendung zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen, zur kosmetischen Behandlung der Epidermis und zur Diagnostik und/oder kosmetischen Behandlung von anderen das Protein "pKe#83" exprimierenden Geweben oder Organen.

15

Auch Sense- und/oder Antisense-Oligonukleotide kommen nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen als Wirkstoffe für eine Pharmakotherapie in Betracht (vgl. G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide*, Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 24, C1115-C1119) - und überdies als 20 Wirkstoffe mit einem in der Pharmakotherapie grundsätzlich neuen Wirkprinzip.

Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Sense- oder Antisense-Oligonukleotide zur Diagnostik 25 und/oder therapeutischen Behandlung, insbesondere von dermatologischen Erkrankungen, oder zur kosmetischen Behandlung, insbesondere der Epidermis.

Eine technisch und wirtschaftlich bedeutende Einsatzmöglichkeit eines 30 erfindungsgemäßen Polypeptids und ebenso einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure besteht nicht zuletzt auch darin, daß mit Hilfe eines solchen

Moleküls in einem "Screening"-Verfahren aus einer sehr großen Anzahl bereitstehender Stoffe solche herausselektiert werden können, die spezifisch an die betreffende Nukleinsäure oder das betreffende Polypeptid binden. Diese Stoffe können dann als Ausgangsmaterial (Leitstruktur) für die 5 Entwicklung pharmakologisch einsetzbarer Substanzen dienen und bieten damit die Voraussetzungen für die Entwicklung alternativer Pharmazeutika zur Diagnose und Therapie, insbesondere der eingangs erwähnten dermatologischen Erkrankungen und/oder anderer Erkrankungen, bei denen das Protein "pKe#83" eine wichtige Rolle spielt.

10

Im Hinblick darauf betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Identifizierung pharmakologisch einsetzbarer Substanzen, die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen 15 bzw. deren Funktion und/oder Expression beeinflussen, insbesondere inhibierend oder aktivierend wirken.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Herstellungs- und Anwendungsbeispielen näher erläutert. Von den im Rahmen dieser 20 Beispiele erwähnten Figuren zeigen

Fig. 1: einen rt-PCR-Nachweis von "pKe#83"-spezifischer mRNA

Fig. 2: das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83

25

Fig. 3: das Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83-FLAG

Fig. 4: einen Immunoblot-Nachweis von rekombinantem pKe#83 Protein in E. Coli-Zellen nach Transfektion mit dem 30 Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83

Fig. 5: einen Immunblot-Nachweis von rekombinantem pKe#83 Protein in Cos-Zellen nach Transfektion mit dem Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83-FLAG

5 Fig. 6: einen Immunblot-Nachweis von anti-Protein pKe#83-Antikörpern aus Kaninchenserum auf rekombinantem pKe#83-Protein (A) und
einen Immunblot-Nachweis von exprimiertem Protein pKe#83 in
transfizierten Cos-Zellen mit anti-Protein-pKe#83-Antikörpern
10 aus Kaninchenserum (B)

Fig. 7: einen "Sandwich"-ELISA-Test unter Verwendung von Antikörpern, die gegen das Protein pKe#83 gerichtet sind.

15 Fig. 8: einen Immunfluoreszenztest unter Verwendung von Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" auf Normalhautschnitten (C), NHEK-Sheets direkt nach Dispase-induzierter Ablösung und (A) und NHEK-Sheets 8 Stunden nach Dispase-induzierter Ablösung (B).

20 Fig. 9: Keratinozyten (HaCaT-Zellen) nach Behandlung mit pKe#83-spezifischen Antisense Oligonukleotiden (B) und Kontroll-Oligonukleotiden (A)

25 **Beispiel 1: Herstellung des Proteins "pKe#83"**

A) **Gewinnung und Herstellung eines Polynukleotids, das das Protein "pKe#83" kodiert**

Als Polynukleotidquelle dienten humane epidermale Keratinozyten einer
30 Zellkultur bzw. eines Zellkulturmodells, das in der Publikation von Schäfer B.M. et al., 1996: *Dispase-mediated basal detachment of cultured*

keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87), *Exp. Cell Res.* 228, pp. 246-253, ausführlich beschrieben ist. Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen. Diese Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodell zeichnet sich dadurch aus, daß sie/es erlaubt, Keratinozyten durch enzymatische Zerstörung der Zell/Matrix-Kontakte, beispielsweise durch eine Dispase-induzierte Ablösung der Keratinozyten von der Kulturmatrix, vom ruhenden $[uPA^-/uPA-R^-]$ in den aktivierte $[uPA^+/uPA-R^+]$ Zustand zu überführen. Die Induktion des aktivierte Zustands ist reversibel: die (erneute) Ausbildung eines konfluenten (= maximal dicht gewachsenen), mehrschichtigen Zellverbands aus differenzierten Keratinozyten führt zur Abregulierung von uPA und uPA-R, d.h. zur Drosselung der Produktion und Einstellung auf einem niedrigeren Konzentrationsspiegel (siehe dazu die Publikation von Schäfer B.M. et al., 1996: *Differential expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPA-R), and inhibitor type-2 (PAI-2) during differentiation of keratinocytes in an organotypic coculture system. Exp. Cell Res.* 220, pp. 415-423).

Die Zellen dieser Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodells werden im folgenden auch als NHEK (= "normale humane epidermale Keratinozyten") bezeichnet.

Für die Bereitstellung der Zellkultur bzw. des Zellkulturmodells wurden folgende Maßnahmen durchgeführt: Mittels Hautbiopsie erhaltene NHEK wurden über Nacht bei 4°C trypsinisiert und anschließend nach der "Feeder Layer"-Technik von J.G. Rheinwald und H. Green (1975, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, Cell* 6, pp. 331-334) in Petrischalen oder in 175 cm² Kulturflaschen für die Dauer von 8 Tagen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem Gehalt von 10 Vol.-% fötalem Kälberserum (FCS) und Zusätzen an Adeninhemisulfat, Insulin, Transferrin,

Trijodthyronin, Hydrocortison, Forskolin, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin und Gentamycin) unter Differenzierungsbedingungen, insbesondere erhöhten Kalziumspiegeln, kultiviert (37°C, 7 % CO₂). Die Kultivierung erfolgte damit gemäß 5 herkömmlicher und im Stand der Technik geläufigen Bedingungen. Unter diesen Bedingungen bilden Keratinozyten konfluente zwei- bis dreischichtige sog. "Epidermisäquivalente" oder Keratinozyten-"Sheets" aus.

Diese Epidermisäquivalente bzw. Keratinozytensheets wurden durch eine 10 30-minütige Behandlung mit Dispase II (2,4 mg/ml in DMEM ohne FCS) von der Kulturmatrix abgelöst, zweimal in DMEM gewaschen und anschließend für die Dauer von 4 - 8 Stunden in komplettem, konditioniertem DMEM inkubiert. Die Inkubation in konditioniertem DMEM erfolgte, um den Einfluß von frischem FCS auszuschließen. Während der Inkubation fand in diesen 15 flotierenden Keratinozytensheets eine Aufregulierung der bekannten Aktivierungsmarker uPA und uPA-R sowie des hierin erstmals beschriebenen Proteins pKe#83 statt. Die uPA/uPA-R-Aufregulierung war mittels bekannter Techniken wie Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA), in situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz nachweisbar. Aus den 20 inkubierten Zellen wurde mittels der im Stand der Technik bekannten Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (vgl.: Chromczynski P. and Sacchi N., 1986: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem.* 162: pp. 156-159) die gesamte RNA gewonnen (Kit "RNA-Clean" der Firma AGS, Heidelberg). Aus der Gesamt-RNA wurde die mRNA 25 mittels Bindung an Poly-T-beschichtete Kugelchen isoliert. Diese mRNA diente als Ausgangsmaterial für den nächstfolgenden Verfahrensschritt der Subtraktionsklonierung.

30 Für den Einsatz in Kontrollversuchen bzw. für Vergleichspräparate wurde mRNA von adhärenten Keratinozytensheets isoliert, und zwar nach dem

gleichen Verfahrensmuster wie vorstehend beschrieben, ausgenommen der Abweichung, daß für die Dauer der Dispasebehandlung zusätzlich zu der Dispase ein Dispasehemmer, z.B. Phosphoramidon (100 µg/ml), appliziert wurde.

5

Nach dem Prinzip der Subtraktionsklonierung wurde eine Genbank erstellt, die vorzugsweise cDNA der dyshäsionsinduzierten Gene enthielt, d.h. solcher Gene, die nach Ablösung der Keratinozytensheets vermehrt in diesen (bzw. deren Zellen) exprimiert wurden. Zu diesem Zweck wurde die 10 aus den Zellen der adhärenen Keratinozytensheets gewonnene mRNA erneut an poly-T-beschichtete Kugelchen gebunden, auf diesen in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und anschließend gegen die mRNA abgelöster, d.h. nicht-adhärenter Keratinozytensheets hybridisiert. Diejenigen mRNA-Moleküle, die lediglich im nicht-adhärenen Zustand, d.h. 15 nach Dyshäsion exprimiert wurden und infolgedessen keinen Hybridisierungspartner fanden, verblieben im Überstand. Sie wurden in cDNA umgeschrieben und in den Klonierungsvektor pUEX-1 kloniert.

Die daraus resultierende Genbank wurde zwecks Überprüfung anschließend 20 noch einem Southernblot-Verfahren mit [³²P]-markierter cDNA adhärenter und nicht-adhärenter Keratinozytensheets unterworfen. Diejenige cDNA oder vielmehr die sie enthaltenden Wirtszellklone - hier des E. coli Stamms MC1061 -, die nach Dyshäsion eine deutliche Aufregulation zeigten, wurden anschließend über Nacht bei 30°C unter üblichen Kulturbedingungen 25 kultiviert bzw. vermehrt. Aus diesen E. coli-Klonen wurde die Plasmid-DNA (pUEX1-cDNA) herauspräpariert, und die aus dem pUEX1-Vektor herausgeschnittenen cDNA-Fragmente wurden mittels Random-priming [³²P]-markiert. Die markierte cDNA wurde als Sonde in Northernblots mit RNA aus adhärenen und nicht-adhärenen Keratinozytensheets eingesetzt. 30 Die Klone, die cDNA enthielten, die bei Verwendung als Sonde im Northernblot-Verfahren kein oder nur ein geringes Signal mit der RNA

adhärenter Keratinozyten, dagegen ein deutliches Signal mit RNA nicht-adhärenter Keratinozytensheets erkennen ließen, wurden für den nachfolgenden Verfahrensabschnitt der Sequenzierung ausgewählt.

5 Bei der Sequenzierung der betreffenden Klone mittels des "nicht-radioaktiven Cycle-Sequencing", das eine Modifikation der Sequenzierungsmethode nach Sanger (F. Sanger et al., 1977: *DNA sequencing with chain terminating inhibitors*, *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467) darstellt und mittlerweile eine dem Stand der Technik geläufige
10 Methode ist, wurde unter anderem das Gen mit der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** und gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 7** erhalten. Außerdem wurden die in den Protokollen **SEQ ID NO: 2** und **SEQ ID NO: 5** dargestellten Splice-Varianten gefunden. Das Gen mit der Nukleotidsequenz gemäß Protokoll
15 **SEQ ID NO: 1** bzw. **SEQ ID NO: 7** und das zugehörige Protein erhielten die Bezeichnung "pKe#83".

Nähere Untersuchungen der zu dem Gen pKe#83 gehörigen, d.h. pKe#83-spezifischen mRNA (aus abgelösten, d.h. nicht-adhärenten
20 Keratinozytensheets) lieferten die Informationen, daß diese mRNA eine Größe von etwa 2,6 kb (**SEQ ID NO:1**) bis etwa 4,9 kb (**SEQ ID NO: 7**) aufweist. Die Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:1** bzw. **SEQ ID NO: 7** enthält am 3'Ende an Position 1651-1653 (**SEQ ID NO:1**) bzw. an Position 3895-3897 (**SEQ ID NO: 7**) ein Stopcodon, das den mutmaßlichen Ort des
25 Transkriptionsendes vorgibt. An Position 2612-2617 gemäß **SEQ ID NO:1** bzw. Position 4856-4261 gemäß **SEQ ID NO: 7**, genau 26 Nukleinsäuren vor der poly-A-Site, befindet sich eine sog. Polyadenylation site. Es wurde eine Splice- Variante (**SEQ ID NO: 2**) gefunden, die um 111 Nukleinsäuren (Position 669-780 gemäß **SEQ ID NO:1**) kürzer ist, und eine zweite Splice-
30 Variante (**SEQ ID NO: 5**), die um 108 Nukleinsäuren (Position 670-777

gemäß SEQ ID NO:1) kürzer ist. Fig. 1.C zeigt das Ergebnis der Klonierung einer pKe#83 -cDNA-Sequenz, es gilt:

5 Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker VI
Spur 2 = SEQ ID NO: 1 (1570 Bp)
Spur 3 = SEQ ID NO: 2 (1460 Bp).

10 Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion konnte gezeigt werden, daß die pKe#83-spezifische mRNA nach Dispase-induzierter Ablösung der NHEK eine Aufregulation erfährt. In Fig. 1.A ist das Ergebnis einer Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (rt-PCR) der mRNA in cDNA und Amplifikation mit pKe#83-spezifischen Oligonukleotid-Primern dargestellt. Dieses Ergebnis beinhaltet die Aussage, daß direkt nach der Ablösung der NHEK nur wenig pKe#83-mRNA vorhanden oder jedenfalls nachweisbar war, daß aber bereits 2 Stunden später eine deutliche Aufregulation festgestellt werden konnte

20 B) Ableitung der Aminosäurenabfolge und Charakterisierung des Proteins "pKe#83" anhand des dafür kodierenden Polynukleotids

Anhand des genetischen Codes der "pKe#83"-cDNA wurde mit Hilfe eines computergestützten Verfahrens (Programm "HUSAR" [= Heidelberg Unix Sequence Analysis Ressources] Version 4.0, Deutsches

25 Krebsforschungszentrum Heidelberg, 1997] von den Nukleotidsequenzen gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 und Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 7 eine Aminosäuresequenz abgeleitet, die in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 8 dargestellt sind. Die strukturelle Analyse dieser Aminosäuresequenzen gemäß Sequenzprotokoll

SEQ ID NO: 3 und **SEQ ID NO: 8** mit eben diesem Programm lieferte folgende Informationen:

Aus der Aminosäurezusammensetzung des Proteins pKe#83 errechnet sich 5 ein Molekulargewicht von 60380 Da (gemäß **SEQ ID NO: 3**) bzw. 122180 Da (gemäß **SEQ ID NO: 8**) mit einem isoelektrischen Punkt von pH 5,3 (gemäß **SEQ ID NO: 3**) bzw. pH 4,9 (gemäß **SEQ ID NO: 8**).

Das Protein pKe#83 weist eine sog. Prenyl-Gruppen-Bindungsstelle ("CAAX 10 Box") auf und eine Reihe möglicher Phosphorylierungsstellen (9x Proteinkinase C, 15x Caseinkinase II, 2x Tyrosinkinase gemäß **SEQ ID NO: 3** und 24x Proteinkinase C, 29x Caseinkinase II, 5x Tyrosinkinase gemäß **SEQ ID NO: 8**). Diese Motive sind ein Hinweis dafür, daß das Protein pKe#83 in Signaltransduktionsabläufe eingebunden ist. Das Protein pKe#83 15 gemäß **SEQ ID NO: 8** weist zudem mehrere (acht) Myristylierungsstellen auf.

Beispiel 2: Nachweis "pKe#83"-spezifischer mRNA in Zellen mittels 20 reverser Polymerasekettenreaktion

Mittels der Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (rt-PCR) wurde pKe#83-spezifische mRNA in Zellen (NHEK) von Keratinozytensheets nach Dispasebehandlung und in HaCaT-Zellen nachgewiesen. Hierfür 25 wurde RNA aus Zellen von Keratinozytensheets nach Dispasebehandlung und unterschiedlich langer weiterer Inkubationszeit und aus HaCaT-Zellen jeweils mit Standardmethoden (Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode) isoliert und nach Standardmethoden in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde einer PCR unterzogen, bei der aus der 30 pKe#83-spezifischen cDNA ein Teilfragment von 388 Bp amplifiziert wurde.

Als Primer-Paar wurde eine Kombination aus pKe#83-forward-10 (¹⁰³²GAATAGACCAGAGATGAAAAGGCAG¹⁰⁵⁶) und pKe#83-reverse-17 (¹⁴¹⁸CGGTTCAGCAGCTCATACC¹³⁹⁹) eingesetzt. Es wurden 10 ng cDNA mit je 10 µM Primer zusammen mit einem Gemisch aus hitzestabiler DNA-Polymerase, ATP, TTP, GTP, CTP und Polymerasepuffer (vgl. z.B.: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons Inc., Suppl. 37, Chapter 15), hier im Beispiel in Form des im Handel gebrauchsfertig erhältlichen "PCR-Master-Mix" der Firma Clontech, in Ansatz gebracht. Zusätzlich wurden folgende Kontrolluntersuchungen durchgeführt: 1. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit dem Plasmid pUEX/pKe#83 anstelle der cDNA ("Positivkontrolle"), 2. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz ohne Zusatz von cDNA ("Negativkontrolle"), 3. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit GAPDH-spezifischen Primern (#302047, Stratagene; "GAPDH-Kontrolle").

15

Die Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. **Fig. 1.A** zeigt das Ergebnis einer pKe#83-spezifischen PCR Auftrennung. Es gilt:

20 Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker VII
(359-8576 Bb, Boehringer Mannheim)
Spur 2 = HaCaT
Spur 3 = HMEC (Zelllinie, in der pKe#83 nicht nachweisbar ist)
Spur 4 = NHEK T0 (direkt nach Ablösung),
25 Spur 5 = NHEK T2 (2 h nach Ablösung)
Spur 6 = NHEK T4 (4 h nach Ablösung)
Spur 7 = NHEK T8 (8 h nach Ablösung),
Spur 8 = pUEX/pKe#83-Plasmid
Spur 9 = keine cDNA.

30

Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von \approx 390 Bp wurde in den Spuren 2, 5 - 8 nachgewiesen, d.h. pKe#83-spezifische mRNA wurde in den Keratinozytensheets (NHEK) zu den Zeitpunkten 2, 4 und 8 Stunden nach Dispase-induzierter Ablösung und ebenso in HaCaT-Zellen nachgewiesen.

5

Fig. 1.B zeigt das Ergebnis einer GAPDH-spezifischen PCR. Es gilt:

Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker VII
10 (359-8576 Bb, Boehringer Mannheim)
Spur 2 = HaCaT
Spur 3 = HMEC
Spur 4 = NHEK T0
Spur 5 = NHEK T2
15 Spur 6 = NHEK T4
Spur 7 = NHEK T8

Diese GAPDH-spezifische PCR ("GAPDH-Kontrolle") beweist, daß ein negatives PCR Ergebnis im pKe#83-spezifischen Ansatz nicht auf ein
20 Nichtvorhandensein von cDNA zurückzuführen ist, da in allen Reaktionsansätzen von T0 - T8 ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 600 Bp nachweisbar war.

Die rt-PCR ermöglicht den Nachweis der pKe#83-Expression auch in Fällen, 25 in denen der Nachweis des pKe#83-Proteins aufgrund zu niedrigen Expressionsspiegels mit immunhistologischen Methoden, dem ELISA oder mit Immunoblot-Verfahren nicht gelingt.

Beispiel 3: Herstellung von Vektormolekülen mit der Fähigkeit zur Expression des Protein pKe#83 in prokaryontischen bzw. eukaryontischen Zellen, sowie Produktion und Reinigung des rekombinanten pKe#83 Proteins

5

Zur Herstellung bzw. Expression des rekombinanten pKe#83-Proteins wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurde das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83 gemäß Vektorprotokoll in **Fig. 2** für die Expression in Bakterien (E. coli DH5 α) hergestellt. Zum anderen wurde das 10 Vektorkonstrukt pcDNA3.1/ pKe#83-FLAG gemäß Vektorprotokoll in **Fig. 3**) zum Zweck der Expression in eukaryontischen Zellen (Cos-Zellen) hergestellt.

Das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83 wurde nach Standardprotokollen für 15 die Transformation von E. coli DH5 α eingesetzt. Das pKe#83-Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprotein wurde in Bakterien exprimiert, das bakterielle Lysat wurde im Immunoblot mit anti-GST-Antikörpern untersucht, und zwar im Vergleich zu Lysat von Bakterien, die mit einem Kontrollplasmid (kein GST) transformiert wurden.

20

Das pKe#83/GST-Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von Gluthathion-Sepharose 4B aus den Bakterienlysaten gereinigt. Die Fraktionen dieser Reinigung wurden dann im Immunoblot mit anti-GST-Antikörpern untersucht.

25

Das Produkt des Immunoblots ist in **Fig. 4.B** abgebildet, **Fig. 4.A** zeigt die entsprechende Proteinfärbung (Ponceau-Rot) des Blots vor Antikörperfärbung. Es gilt:

30

Spur 1 = Bakterienlysat der Kontrolltransfektante

Spur 2 = Bakterienlysat der pUEX-2T/pKe#83-GST Transfektante
Spur 3 = Säulendurchlauf
Spur 4 - 6 = Waschfraktion 1-3
Spur 7-11 = Elutionsfraktion
5 Spur 12 = pKe#83/GST-Fusionsprotein vor Thrombinverdau
Spur 13 = pKe#83/GST-Fusionsprotein nach Thrombinverdau

Das pKe#83/GST-Fusionsproteins hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 90 KDa. Das erlaubt den Schluß, daß das 90 KDa pKe#83/GST-Fusionsprotein aus dem GST-Protein (ca. 26 kDa) und einem ca. 60 - 65 KDa großen Fragment des Proteins pKe#83 besteht.

Im eukaryontischen System wurde der pcDNA3.1/pKe#83-FLAG Vektor (Fig. 3) in sog. Cos-Zellen, d.h. in Zellen der im Stand der Technik allgemein 10 bekannten Cos-Zelllinie, transformiert. Die Zellen wurden nach Standardverfahren durch Behandlung mit DEAE-Dextran/Chloroquin zur Aufnahme der Plasmid-DNA gebracht. Danach wurden die transformierten Zellen drei Tage unter Standardbedingungen (37°C und 7 % CO₂) inkubiert. 15 Die Cos-Zellen wurden lysiert und im Immunoblot unter Verwendung eines 20 Antikörpers gegen das FLAG-Epitop analysiert. Fig. 5 zeigt das Produkt des Immunoblots:

Spur 1 = mit pcDNA3.1/pKe#83-FLAG Vektorkonstrukt transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit einem isotyp-identischen Kontroll-Antikörper,
25 Spur 2 = mit dem pcDNA3.1 Vektor (ohne pKe#83) transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit einem isotyp-identischen Kontroll-Antikörper,
Spur 3 = mit pcDNA3.1/pKe#83-FLAG Vektorkonstrukt transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit dem anti-FLAG Antikörper,
30

Spur 4 = mit dem pcDNA3.1 Vektor (ohne pKe#83) transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit dem anti-FLAG Antikörper,
Spur 5 = FLAG-markiertes Kontrollprotein das die Funktionalität des anti-FLAG-Antikörpers zeigt.

5

Das Ergebnis dieses Versuch belegt die Expression des pKe#83-FLAG-Fusionsproteins in Cos-Zellen, die mit dem Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83-FLAG transfiziert wurden.

10

Beispiel 4: Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen das pKe#83 Protein, sowie immunologischer Nachweis des pKe#83 Proteins mittels Immunoblot ("Westernblot"), Immunhistologie und Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Gereinigtes rekombinantes pKe#83-Nichtfusionsprotein wurde für die adjuvantunterstützte Immunisierung von Kaninchen und Mäusen eingesetzt. Die Details des Immunisierungsverfahrens sind im Stand der Technik 20 allgemein geläufig. Die Immunisierung von Kaninchen wurde im Kundenauftrag von der Fa. Dr. J. Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt. Es wurden Seren vor ("Präimmunserum") und nach ("Postimmunserum") Immunisierung gewonnen. Aus den Seren wurde die IgG-Fraktion nach Standardverfahren mittels Ammoniumsulfatfällung isoliert. 25 Die resultierenden IgG-Präparationen werden im folgenden als "anti-pKe#83 IgG" bezeichnet.

Das Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" zeigte eine deutliche Immunreaktion mit dem für die Immunisierung verwendeten rekombinanten pKe#83 Protein. 30 Das Produkt dieses Immunblots ist in Fig. 6.A dargestellt. Es gilt:

Spur 1 = Präimmun Kaninchen IgG, 1:10 000 verdünnt,
Spur 2 = anti-pKe#83 IgG 1:50 000 verdünnt
Spur 3 = anti-pKe#83 IgG 1:100 000 verdünnt
5 Spur 4 = anti-pKe#83 IgG 1:200 000 verdünnt

Der Pfeil markiert die Position des pKe#83-Proteins.

10 Mit dem polyklonalen Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" und polyklonalem Maus "anti-pKe#83 IgG" wurden darüberhinaus Zellysate von pKe#83-transfizierten Cos-Zellen im Immunblotverfahren auf die Expression des Proteins pKe#83 getestet. Das Produkt dieses Immunblots ist in Fig. 6.B dargestellt. Es gilt:

15 Spur 1 = Präimmun Kaninchen IgG,
Spur 2 = Kaninchen "anti-pKe#83 IgG",
Spur 3 = normal Maus IgG,
Spur 4 = Maus anti-pKe#83 IgG,
20 Spur 5 = anti-FLAG Antikörper.

Immunhistologie: Mit Hilfe eines Kryotoms wurden 5 µm-dicke Gefrierschnitte von Geweben aus Hautbiopsien von klinisch unauffälliger 25 Normalhaut und von Dispase-abgelösten NHEK-"Sheets" zum Zeitpunkt T0 und T8 hergestellt. Diese wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 100 % Azeton fixiert (anstelle von Azeton kann ebensogut auch 100 % Methanol, 100 % Ethanol oder 4 %-iges Paraformaldehyd verwendet werden). Danach wurden die Schnitte gemäß im Stand der Technik 30 bekannter sog. "Blockierungsverfahren" behandelt, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Im vorliegenden

Beispielfall wurden zwei Blockierungsschritte durchgeführt: (1) eine Blockierung mit Avidin/Biotin und (2) eine Blockierung mit Normalserum. Im ersten Blockierungsschritt wurde die Avidin/Biotin-Blockierung unter Verwendung des Avidin/Biotin-Blockierungskits der Firma Vector-
5 Laboratories nach Herstellervorschrift eingesetzt, d.h. es wurde bei Raumtemperatur zunächst 15 Minuten mit der Avidin-Fertiglösung und nachfolgend 15 Minuten mit der mit der Biotin-Fertiglösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 10 Vol-% Normalserum in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Normalserum der Spezies, aus der
10 der Zweitantikörper stammt, hier Ziege-Normalserum, PBS = Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2 - 7,4).

Im Anschluß an die Blockierung wurden die Schnitte in PBS mit einem Gehalt an 5µg/ml Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" für 1 Stunde bei
15 Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des nichtgebundenen Antikörpers wurden die Schnitte anschließend in PBS mit einem Gehalt an 0,2 % (Gewicht/Volumen) bovinem Serumalbumin gewaschen. Es folgt die Inkubation mit einem beispielsweise Biotin-markierten und gegen Kaninchen-IgG-gerichteten Antikörper aus der Ziege (1:500 verdünnt in
20 PBS/ 0,2% BSA; 30 Minuten bei Raumtemperatur), ein weiterer Waschschritt, sowie die Aufbringung eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3-markierten Streptavidins (1 : 1000 in PBS/0,2 % BSA verdünnt). Anstelle von Cy3 kann auch ein anderer Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung des Streptavidins verwendet werden, z.B. FITC. Nach einem
25 letzten Waschschritt wurden die Schnitte mit Eideckmedium, z.B. Elvanol oder Histogel, eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht und ausgewertet.

In Fig. 8 sind die Ergebnisse eines derart durchgeführten
30 Immunfluoreszenztests dargestellt: Das Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" zeigt auf Normalhautschnitten eine schwache intrazelluläre und eine starke

5 Zellmembran-assoziierte Immunfärbung (Fig. 8.C). Die NHEK "Sheets" T0 (= direkt nach Dispase-induzierter Ablösung vom Substrat) zeigen nur eine leichte Hintergrundfärbung (Fig. 8.A) während die NHEK "Sheets" T8 (= 8 Stunden nach der Dispase-induzierten Ablösung vom Substrat) eine deutliche Immunfärbung aufweisen (Fig. 8.B). Dieses Ergebnis beinhaltet die Aussage, daß direkt nach der Ablösung wenig Protein pKe#83 vorhanden oder jedenfalls nachweisbar war, aber 8 Stunden später bereits eine vermehrte Expression stattgefunden hatte und infolgedessen deutlich höhere Mengen Protein pKe#83 nachgewiesen werden konnten.

10

15 **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA):** Zur Quantifizierung des pKe#83-Proteins in komplexen Lösungen wurde ein sog. "Sandwich"-ELISA (Fig. 7) durchgeführt. Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte mit einem gegen pKe#83 gerichteten Antikörper (z.B. Kaninchen anti-pKe#83 IgG, 1 µg/Vertiefung) beschichtet. Dann wurden die noch verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen der Mikrotiterplatte durch Behandlung mit 0,1 Gewichts-% Gelatine in phosphatgepufferter Kochsalzlösung ("PBS/Gelatine") blockiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Konzentration des pKe#83-Proteins als Kalibrator, bzw. mit Verdünnungen unbekannter Proben (in denen die pKe#83-Konzentration festgestellt werden sollte) in Ansatz gebracht. Nach einem Waschschnitt mit 0,05 Volumen-% Tween-20 in PBS (PBS/Tween) wurde die Platte mit einer IgG Präparation aus einer zweiten Spezies (z.B. mit Maus anti-pKe#83 IgG) 20 inkubiert (z.B. eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur). Nach einem weiteren Waschschnitt mit PBS/Tween wurde die Platte mit einer Peroxidase-markierten kommerziellen Kaninchen anti Maus-IgG Antikörper-Präparation inkubiert (z.B. Fc-spez. Fab₂-POX von Dianova GmbH, Hamburg). "Peroxidase" steht hier stellvertretend für praktisch jede beliebige 25 Markierung des Antikörpers, z.B. mit Enzymen, Fluoreszenzmolekülen oder 30

Lumineszenzmolekülen. Nach einem weiteren Waschschritt zur Entfernung ungebundener enzymmarkierter Antikörper wurde das farblose Peroxidase-Substrat Ortho-Phenyldiamin zugesetzt, welches durch die Peroxidase-Aktivität in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Quantifizierung der 5 Farbbildung erfolgt in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 490 nm gegen 405 nm (Ordinate).

Das Ergebnis des Versuchs ist in **Fig. 7** dargestellt. Es zeigt, daß die Farbkonzentration (angegeben als Absorption in der Ordinate) der Menge 10 des eingesetzten pKe#83-Proteins (= des "Kalibrators", in der Abszisse dargestellt) proportional ist. Um die Funktionalität des Testsystems zu demonstrieren, wurden gleichzeitig Lysate von zwei verschiedenen Cos-Transfektanten-Ansätzen getestet, die sich in der Expression von pKe#83 unterscheiden. Die Cos-Zellen des einen Ansatzes wurden mit dem 15 Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83 (Ansatz "Cos pKe#83") und die des anderen Ansatzes mit dem pcDNA3.1 Vektor ohne Insert (Ansatz "Cos") transfiziert.

Zellen dieser Transfektanten-Ansätze wurden nach Standardverfahren unter 20 Verwendung des Detergentes Triton X-100 lysiert. Diese Lysate wurden in einer 1:10-Verdünnung in PBS/Tween 20 im ELISA getestet. Lysate des "Cos pKe#83"-Transfektanten-Ansatzes zeigten eine positive Reaktion zeigen. Unter Berücksichtigung der Kalibratordaten wurde eine Konzentration von ca. 120 ng pKe#83/ 10^6 Cos pKe#83-Zellen festgestellt. 25 Bei den Lysaten der Kontroll-Transfektanten-Ansätze "Cos" konnte kein Protein pKe#83 nachgewiesen werden. Durch den Einsatz dieses Testverfahrens ist folglich eine Quantifizierung einer unbekannten Menge des Proteins pKe#83 in einer Probe möglich.

30 Die Substanz Ortho-Phenyldiamin steht hier stellvertretend für jedes beliebige Peroxidase-Substrat, das infolge der Peroxidase-Aktivität seine

Farbe nachweisbar verändert. Anstelle der hier beispielhaft verwendeten polyklonalen Antikörper können ebensogut monoklonale Antikörper, die gegen das Protein pKe#83 gerichtet sind, eingesetzt werden. Anstatt des indirekten Ansatzes über einen markierten speziespezifischen anti-IgG 5 Antikörper kann auch die Durchführung mit einem direkt markierten anti-pKe#83-Antikörper erfolgen.

10 **Beispiel 5: Beeinflussung von Keratinozyten durch pKe#83-
spezifische Oligonukleotide**

Antisense-Oligonukleotide werden von Zellen, auch Keratinozyten, aufgenommen (vgl.: G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide, Deutsches Ärzteblatt* 95, Heft 24, C1115 - C1119). Sie binden in spezifischer 15 Weise an die in der Zelle vorliegende mRNA und hemmen deren Translation und damit die Expression des entsprechenden Proteins (vgl.: Y.-S. Lee et al. 1997, *Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C α in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes, Molecular Carcinogenesis* 18: 44-53). 20 Geeignete Antisense-Oligonukleotide wurden anhand der pKe#83-spezifischen Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 1 bzw. SEQ ID NO: 7) hergestellt. Sie wurden mit geeignetem Puffermedium (sog. "Oligopuffer") auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt. HaCaT-Zellen wurden bei 37°C und 7 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert. Die Zellen 25 wurden abtrypsinert (10 Minuten 0,2 Gewichts-% EDTA, 0,1 Gewichts-% Trypsin, 5 - 10 Minuten) und auf eine Konzentration von 25 000 Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer Mikrotiter-Kulturplatte (96 Vertiefungen) wurden 100 μ l Zellsuspension (entspricht 2500 Zellen) einpipettiert. Die Zellen wurden 1 Stunde unter den vorgenannten Kultivierungsbedingungen 30 inkubiert, danach erfolgte die Zugabe des Antisense-Oligonukleotids (2 μ l

einer 100 µM-Lösung) und eine weitere Inkubation von 24 - 48 Stunden. Als Negativkontrolle dienten Zellansätze, denen Oligonukleotide mit der gleichen Basenverteilung aber zufällig ausgewählter Sequenz zugegeben wurden.

5

Die solcherart behandelten Zellen wurden mit Hilfe eines Mikroskops hinsichtlich phänotypischer Veränderungen untersucht. Das Ergebnis der mikroskopischen Analyse ist in **Fig. 9** dargestellt: **Fig. 9.A** zeigt HaCaT-Zellen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt worden sind, **Fig. 9.B** zeigt HaCaT-Zellen, die mit pKe#83-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelt worden sind.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß in den mit Antisense-Oligonukleotiden behandelten HaCaT-Kulturen stark vergrößerte Zellen 15 auftraten (**Fig. 9.B**, Pfeile), die in den mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelten Kulturen nicht zu finden waren. Diese großen Zellen entsprechen in ihrer Morphologie differenzierten Keratinozyten. Der Befund weist darauf hin, daß mit pKe#83-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelte Zellen eine vermehrte Tendenz zur Differenzierung aufweisen.

20

A n s p r ü c h e**1. Isoliertes Polypeptid,**

das einem natürlicherweise in humanen epidermalen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten, durch eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker uPA und uPA-R gekennzeichneten Zustand dieser Keratinozyten aufregulierten, nämlich verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist,
und das entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 8 dargestellte oder eine durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion als Allel oder Derivat daraus entstandene Aminosäuresequenz aufweist, wobei SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 und oder SEQ ID NO: 8 Bestandteil dieses Anspruchs sind,
und wobei die durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion als Allel oder Derivat entstandenen Aminosäuresequenzen zur Beeinflussung der Zellmorphologie, Zellproliferation, Zelladhäsion, Zellmigration und/oder Zelldifferenzierung geeignet sind.

2. Isolierte Nukleinsäure,

die ein Protein gemäß Anspruch 1 codiert,
und die entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 7 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz
oder eine Teilsequenz einer dieser Nukleotidsequenzen
oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist, wobei SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 7 Bestandteil dieses Anspruchs sind.

3. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure aus einer natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen Quelle gewonnen ist.
4. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure eine cDNA ist.
5. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure ein Sense- oder Antisense-Oligonukleotid ist, das mindestens 6, vorzugsweise 8 bis 25 Nukleotide umfaßt und mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 oder mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleotidsequenz oder Teilsequenzen davon hybridisiert.
6. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure eine Splice-Variante ist, die mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 oder mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleotidessequenz hybridisiert.
7. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure eine Splice-Variante ist, die die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 5 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist.

8. Isoliertes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus einer Splice-Variante
einer mRNA resultiert, welche
entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 oder die im Sequenz-
protokoll SEQ ID NO: 7 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine hierzu
komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser
Nukleotidsequenzen
oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser Nukleotidsequenzen
hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist,
daß es in aktivierten humanen epidermalen Keratinozyten mit erhöhter
Expression der Aktivierungsmarker uPA und uPA-R aufreguliert wird,
und daß es zur Beeinflussung der Zellmorphologie, Zellproliferation,
Zelladhäsion, Zellmigration und/oder Zelldifferenzierung geeignet ist.

9. Isoliertes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus einer Splice-Variante
einer mRNA resultiert, welche die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 2 oder
im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 5 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist.

10. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
daß es die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 4 oder die im Sequenzprotokoll
SEQ ID NO: 6 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, wobei
SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6 Bestandteil dieses Anspruchs sind.

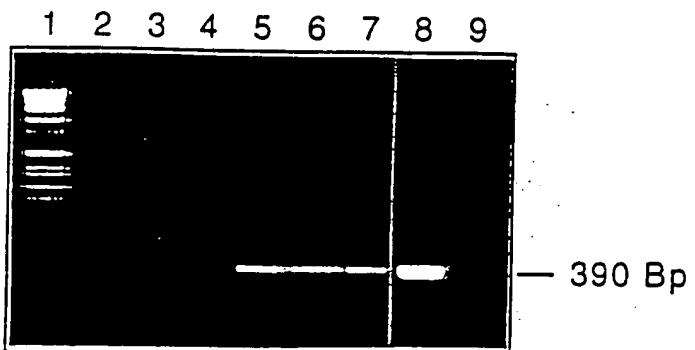
11. Rekombinantes DNS-Vektormolekül, das eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 7 umfaßt, und das die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweist.
12. Rekombinantes DNS-Vektormolekül nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Vektormolekül ein Abkömmling des Plasmids pUEX-1 oder des Plasmids pGEX-2T oder des Plasmids pcDNA3.1 ist.
13. Rekombinantes DNS-Vektormolekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Vektormolekül ein Konstrukt gemäß Vektorprotokoll in Fig. 2 oder gemäß Vektorprotokoll in Fig. 3 ist, wobei dieses Vektorprotokolle Fig.2 und Fig.3 Bestandteile dieses Anspruchs sind.
14. Transformierte Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 7 enthält, welche mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in der Wirtszelle natürlicherweise oder als Folgen einer Rekombination enthalten ist, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins aufweist.
15. Transformierte Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor der Zytokeratin-14-Promotor und die Wirtszelle ein Keratinozyt ist, oder daß der Promotor der CMV-Promotor und die Wirtszelle eine Cos-Zelle ist.

16. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder eines Vektormoleküls nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur Herstellung transgener Säugetiere.
17. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 8 zur Herstellung eines Antikörpers gegen dieses Polypeptid und/oder damit verwandter Proteine.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung eingesetzt wird.
19. Antikörper, der spezifisch mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 8 reagiert.
20. Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz unter Verwendung wenigstens einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 und/oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 8 hergestellt ist.
21. Verwendung eines Sense- oder Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 5 oder Anspruch 6 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung.

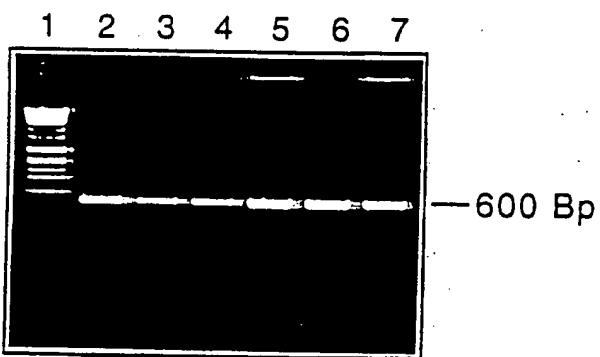
22. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 8 oder einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 zur Identifizierung von medizinisch, kosmetisch oder pharmakologisch einsetzbaren Substanzen, die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen/deren Funktion und/oder Expression beeinflussen.

A

1 / 9



B



C

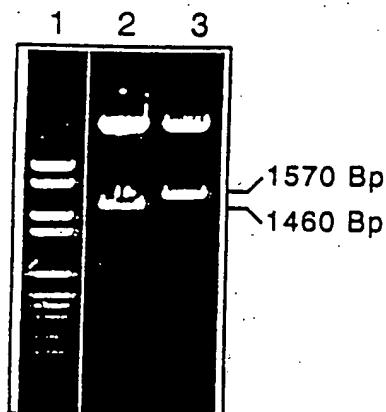


Fig. 1

Fig. 2

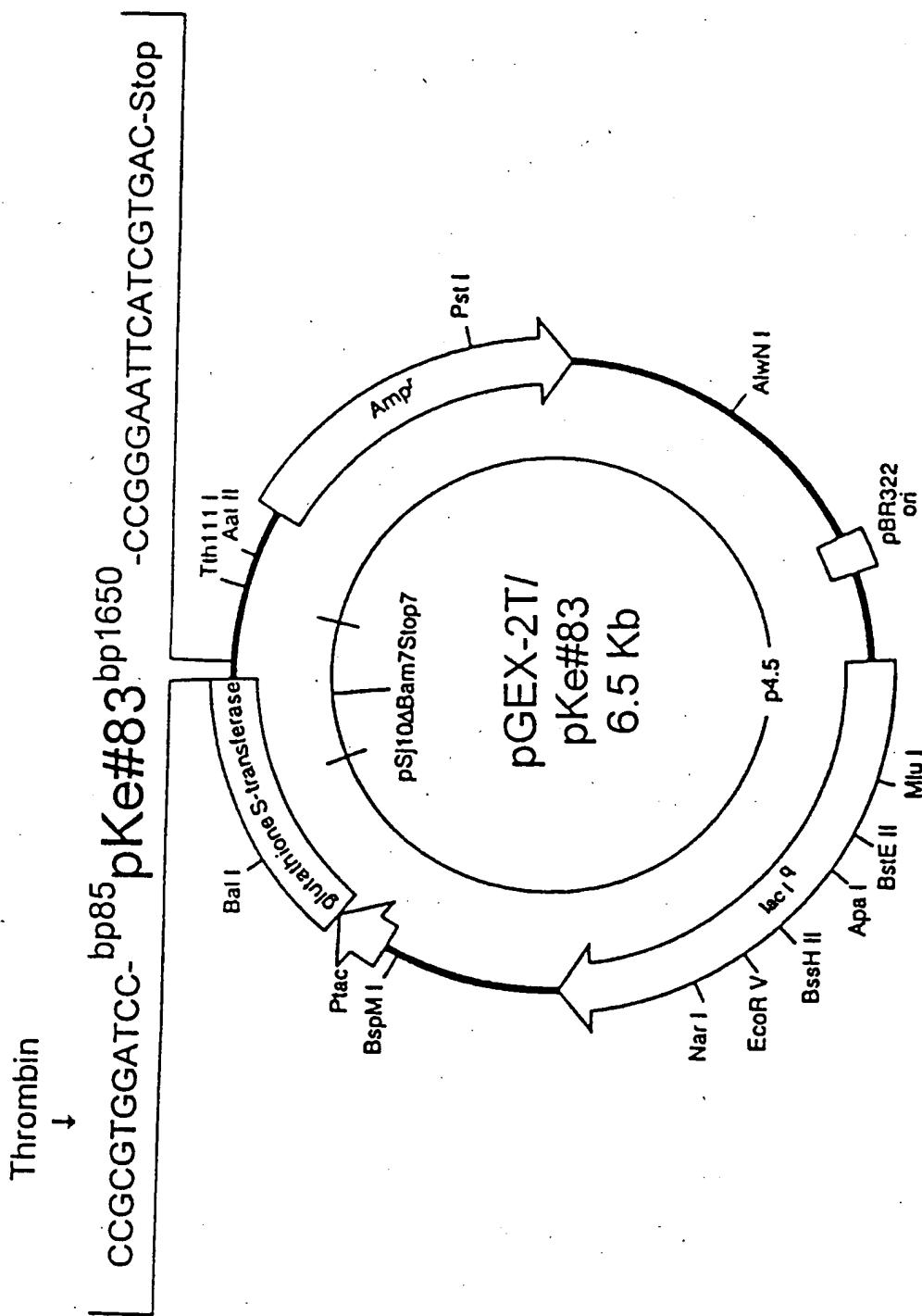
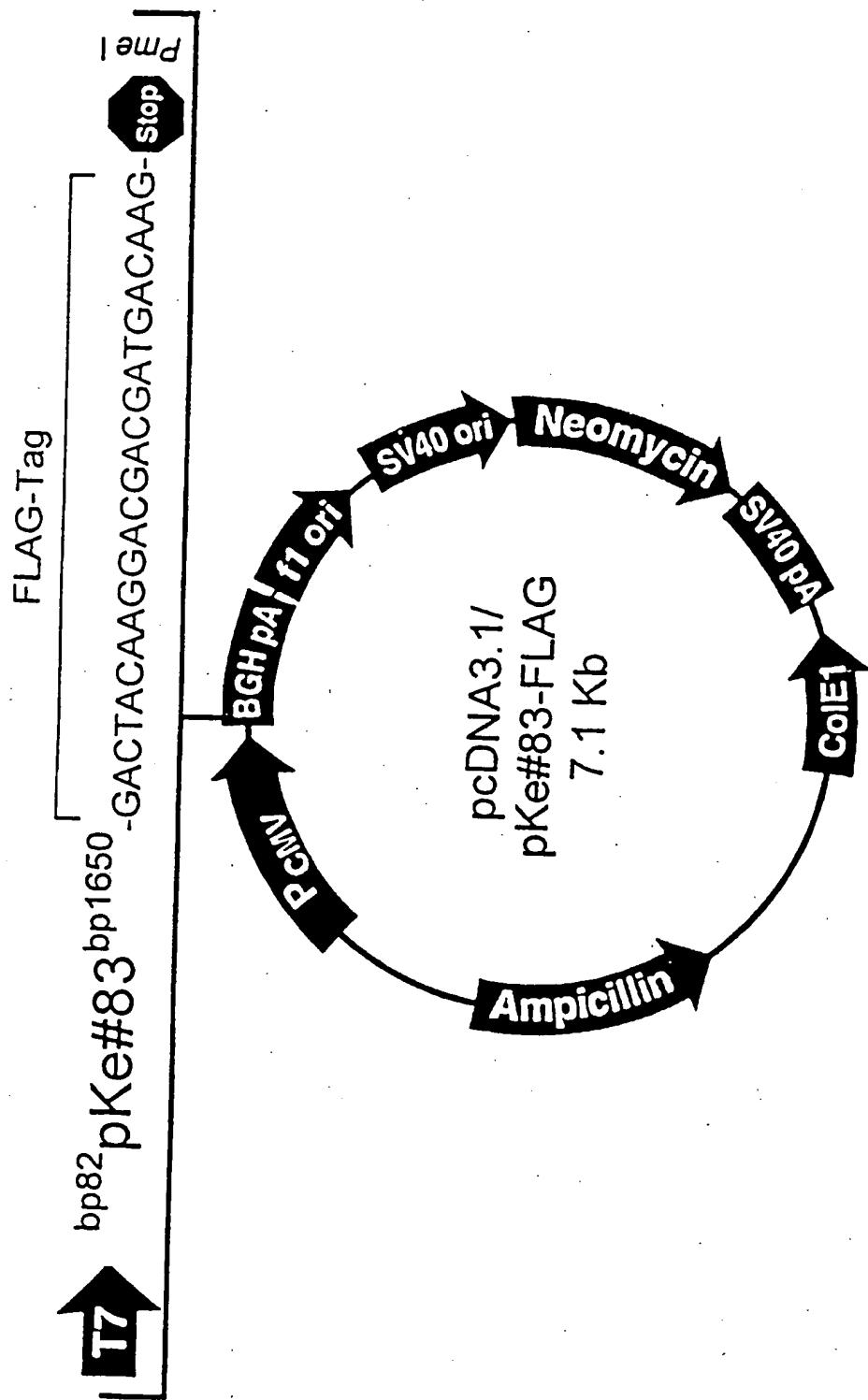


Fig. 3



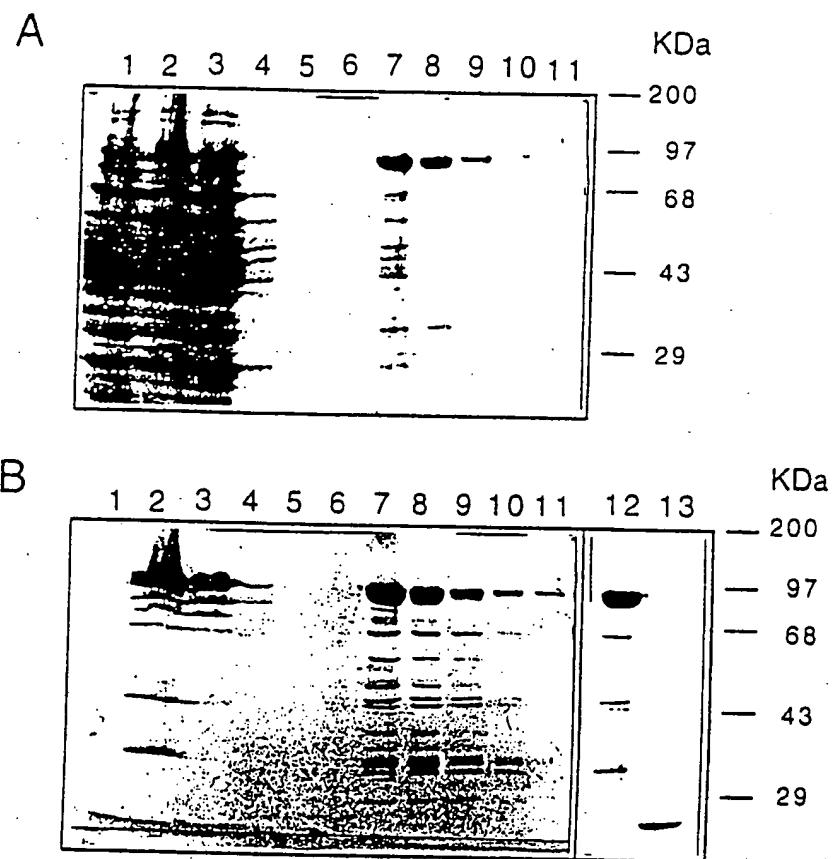


Fig. 4

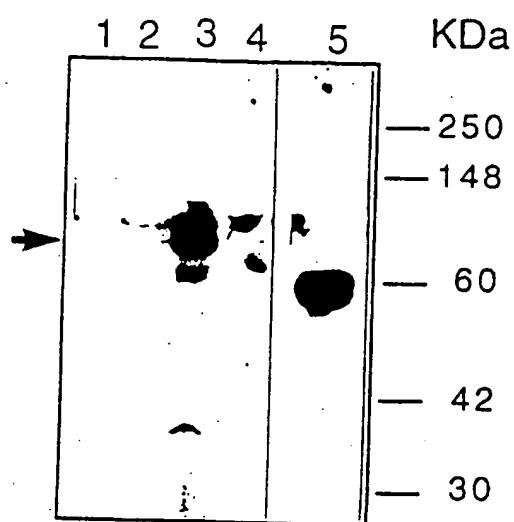


Fig. 5

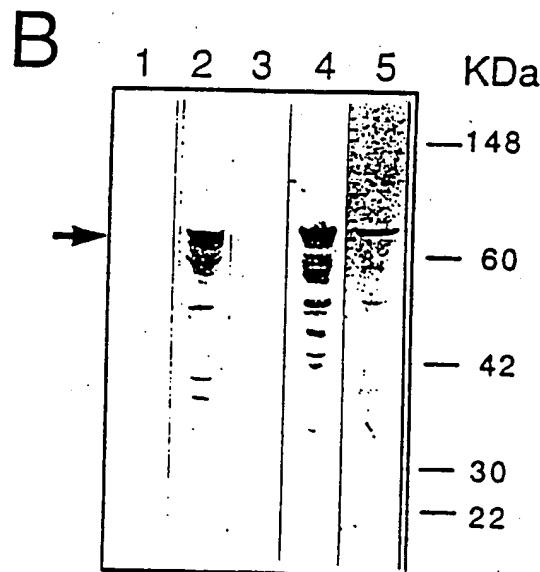
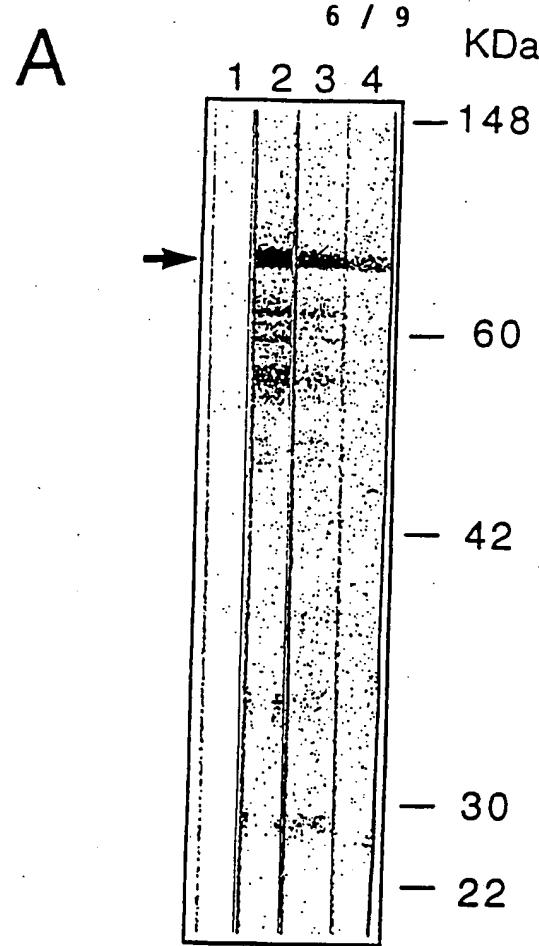
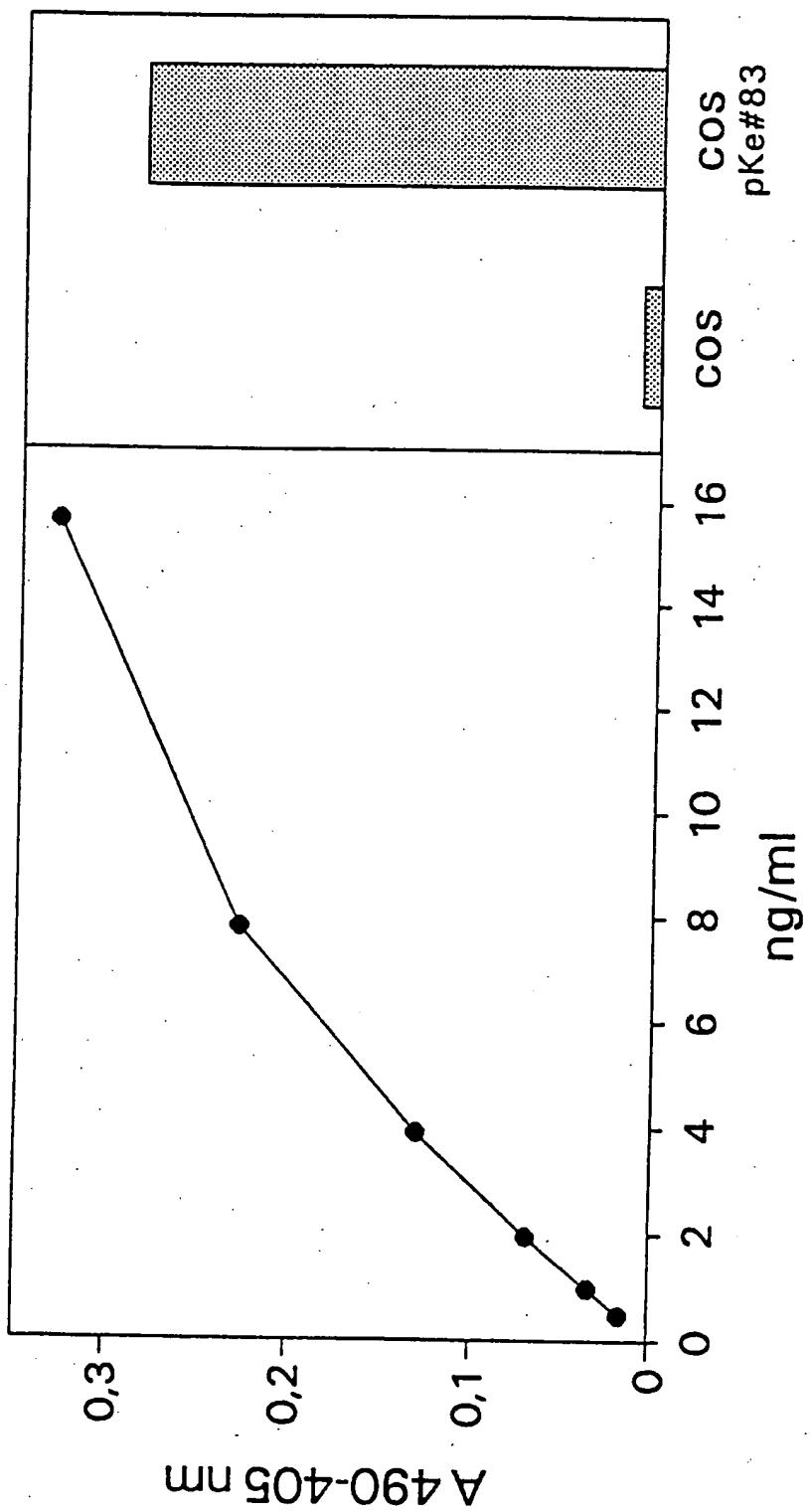
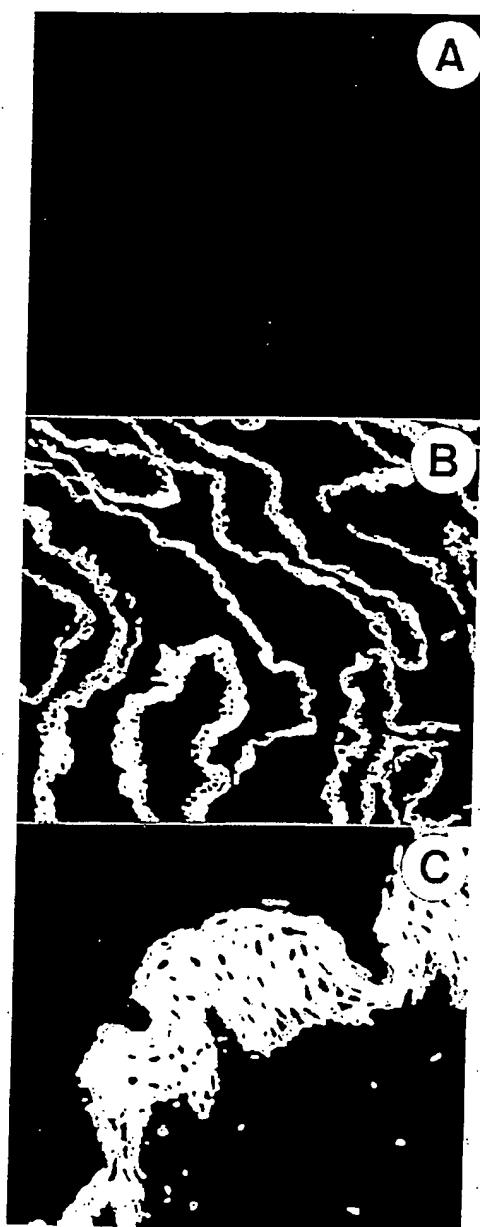


Fig. 6

Fig. 7





BEST AVAILABLE COPY

Fig. 8

9 / 9

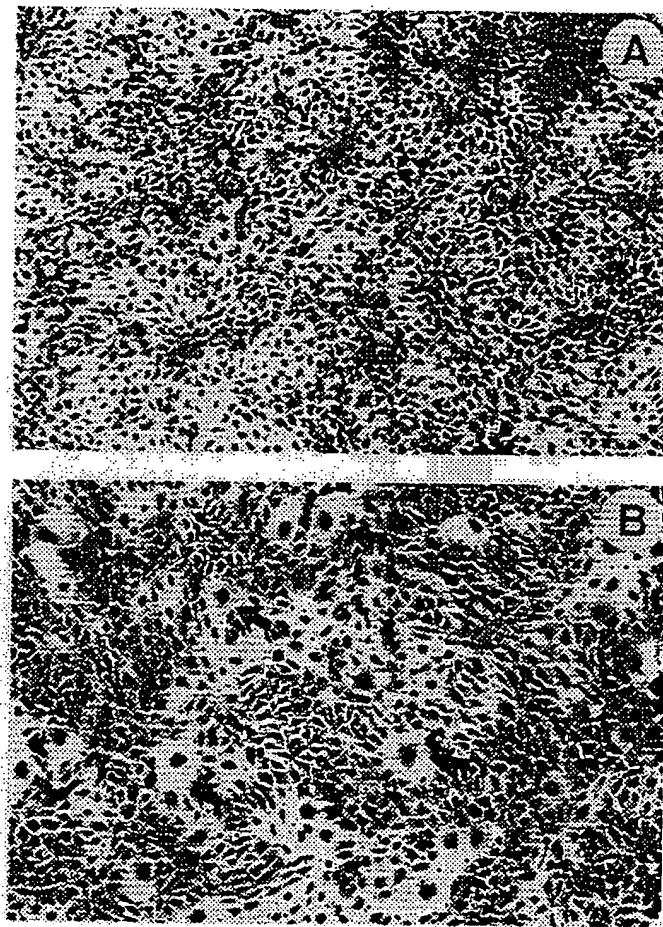


Fig.9

SEQUENZPROTOKOLLE

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Dr. Michael Kramer
STRASSE: Bergstraße 85
ORT: Pfungstadt
BUNDESLAND: Hessen
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 64319

VERTRETER:

NAME: Dr. Ulrike Rudolph
STRASSE: In der Schanz 10
ORT: Schriesheim
BUNDESLAND: Baden-Württemberg
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 69198
VERTRETERNUMMER: 246 263
AKTENZEICHEN: km-3#

TELEKOMMUNIKATION:

TELEFON: 06203-61348
TELEFAX: 06203-64196

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Regulatorisches Protein pKe#83 aus humanen Keratinozyten

ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM-kompatibler PC
BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS
SOFTWARE: Microsoft WORD für Windows 97

ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 2667 Basenpaare
 ART: Desoxyribonukleinsäure
 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA

HYPOTHETISCH: nein

ANTI-SENSE: nein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens
 STAMM: kaukasisch
 ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
 ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: cDNA aus Keratinozyten

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für
 regulatorisches Protein pKe#83
 aus humanen Keratinozyten

LAGE: von 1 bis 2667

ERMITTlungSMETHODE: cDNA-Sequenzierung

SEQ ID NO: 1

```

1  GTTTGTTAG GCAAAAGAG ACTATTGAAA GCTGAGACTT TAGAATTGAG
51  TGACTTATAT GTTAGTGATA AGAAGAAGGA TATGTCTCCA CCCTTTATT
101  GTGAGGAGAC AGATGAACAA AAGCTTCAAA CTCTAGACAT CGGTAGTAAC
151  TTGGAGAAAG AAAAATTAGA GAATTCCAGA TCCTTACAAT GCAGATCAGA
201  TCCAGAATCT CCTATCAAAA AAACAAGTTT ATCTCCTACT TCTAAACTTG
251  GATACTCATA TAGTAGAGAT CTAGACCTTG CTAAGAAAAA ACATGTTCC
301  CTGAGGCAGA CGGAGTCTGA TCCAGATGCT GATAGAACCA CTTAAATCA
351  TGCAGATCAT TCATCAAAAA TAGTCCAGCA TCGATTGTTA TCTAGACAAG
401  AAGAACTTAA GGAAAGAGCA AGAGTTCTGC TTGAGCAAGC AAGAAGAGAT
451  GCAGCCTTAA AGGCGGGAA TAAGCACAAT ACCAACACAG CCACCCATT
501  CTGCAACAGG CAGCTAAGTG ATCAGCAAGA TGAAGAGCGA CGTCGGCAGC
551  TGAGAGAGAG AGCTCGTCAG CTAATAGCAG AAGCTCGATC TGGAGTGAAG
601  ATGTCAGAAC TTCCCAGCTA TGGTGAATG GCTGCAGAAA AGTTGAAAGA
651  AAGGTCAAAG GCATCTGGAG ATGAAAATGA TAATATTGAG ATAGATACTA

```

701	ACGAGGAGAT	CCCTGAAGGC	TTTGTGTAG	GAGGTGGAGA	TGAACCTACT
751	AACTTAGAAA	ATGACCTTGA	TACTCCGAA	CAAAACAGTA	AGTTGGTGGA
801	CTTGAAGCTG	AAGAAGCTCC	TAGAAGTTCA	GCCACAGGTG	GCAAATTACAC
851	CCTCCAGTGC	TGCCAGAAA	GCTGTAACTG	AGAGCTCAGA	GCAGGACATG
901	AAAAGTGGCA	CAGAAGATCT	CCGGACTGAA	CGATTACAAA	AAACAAACAGA
951	ACGTTTAGA	AATCTGTG	TGTTCAGCAA	AGATTCTACA	GTCAGAAAAA
1001	CTCAACTTCA	GTCTTCAGC	CAATATATTG	AGAATAGACC	AGAGATGAAA
1051	AGGCAGAGAT	CAATACAGGA	AGATACAAAG	AAAGGAAATG	AGGAGAAGGC
1101	AGCGATAACT	GAAACTCAGA	GGAAGCCATC	AGAAGATGAA	GTGCTTAATA
1151	AAGGGTTCAA	AGACACCACT	CAGTATGTAG	TAGGAGAATT	GGCAGCACTA
1201	GAGAATGAGC	AAAAGCAAAT	TGACACCCGT	GCCCGCCTGG	TGGAGAAGCG
1251	CCTTCGCTAT	CTCATGGACA	CAGGAAGGAA	CACAGAAGAA	GAAGAAGCTA
1301	TGATGCAGGA	ATGGTTATG	TTAGTTAATA	AGAAAAATGC	CTTAATAAGG
1351	AGAATGAATC	AGCTCTCTCT	TCTGGAAAAA	GAACATGATT	TAGAACGACG
1401	GTATGAGCTG	CTGAACCGGG	AATTGAGGGC	AATGCTAGCC	ATTGAAGACT
1451	GGCAGAAGAC	CGAGGCCAG	AAGCGACGCG	AACAGCTTCT	GCTAGATGAG
1501	CTGGTGGCCC	TGGTGAACAA	GCGCGATGCG	CTCGTCAGGG	ACCTGGACGC
1551	GCAGGAGAAG	CAGGCCGAAG	AAGAAGATGA	GCATTTGGAG	CGAACTCTGG
1601	AGCAAAACAA	AGGCAAGATG	GCCAAGAAAG	AGGAGAAATG	TGTTCTTCAG
1651	TAGCCATCAG	ATCAGAAAGA	ATCTCTCCA	ACATTTAGA	GTCTGCTTC
1701	CCAAACCAGA	AAAAGTCAGA	CTCATTGTTG	ATTAAAAACT	TTAACATTT
1751	TGTTGGCTG	GATTGACTA	CTTTACCTCT	ACTTTACAC	CACCACCCCTT
1801	TTCCCTCCCTC	CTTTCCAAT	AATATACAGA	ACTCCAAAAT	AGCTTCATTT
1851	AAGGATTTT	TTGTGAGTTA	ACAATTCTCT	TGAAATCCTG	TGAAATAGAT
1901	TTGCACAGAC	ACCTTGTGAG	TGATTGGTAT	TGGAGGTGTT	CAAGAAACTG
1951	TTCGAAAAAG	AACAAAAACA	CTTCCCTCGT	TATTTCTCT	CATTTTTGA
2001	TGAGAGGAAA	ATTGAAACA	TTATTCTGT	TGTTGTTGGT	AATAGCATAA
2051	TGACAGTGGG	AGGGGTACAA	GGGGATAAGA	AAAATGTCAT	GATTTTTTC
2101	CGGTCTGCCC	ACATGTAACA	CTTACTCTGT	TACCTAAATT	TTATAGTTAG
2151	ATCATATCCA	ATCTACTTAT	TAAACTGTGT	TCTATTAC	AGTGGAGTTT
2201	TTCTGCAGTG	GTTGCGTTTC	ACTGTAAGGA	TAATGGAGTT	CCTCTCCTCT
2251	GCTTCCTCA	GAGGATGGTC	CTTTAACATA	GCCAGAAACA	AGCCCTGTGG
2301	TTTGAAGGTG	AGCTGTGAGG	ATGGGACTAA	TTGATATGCA	CCAGTTTACA
2351	AAGACAGTCT	TATCATCCGA	GAATACACCA	TCTTTTCTC	TGGATAATT
2401	TTTCTTACAT	CATGCTTGAT	TCCTACATTT	TGTTGGTTT	CAACATTGGC
2451	TCACGAATGC	TGTTAATATT	TATTCTGTAT	TGATAAAAAG	TCTGTCTGC
2501	CACTACAAGT	AAATCCCCCA	TTAATATT	TCTTCTTTAG	CATAGCACTG
2551	TCATTTTTG	TGAAAATGGT	TATGTTTATT	TATTACAATA	CTGAGTCATA
2601	TATAAATTT	CAATAAAAGC	AGAAAATTC	TTACCTAAA	AAAAAAAAAA
2651	AAAAAAAAAA	AAAAAAA			

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 2547 Basenpaare
 ART: Desoxyribonukleinsäure
 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA

HYPOTHETISCH: nein

ANTI-SENSE: nein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens
 STAMM: kaukasisch
 ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
 ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: cDNA aus Keratinozyten

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Splice-Variante einer kodierende Sequenz
 für das regulatorische Protein pK#83
 aus humanen Keratinozyten

LAGE: von 1 bis 2547

ERMITTlungSMETHODE: cDNA-Sequenzierung

SEQ ID NO: 2

```

1 GTTTGTTAG GCAAAAGAG ACTATTGAAA GCTGAGACTT TAGAATTGAG
51 TGACTTATAT GTTAGTGATA AGAAGAAGGA TATGTCTCCA CCCTTATTT
101 GTGAGGAGAC AGATGAACAA AAGCTTCAA CTCTAGACAT CGGTAGTAAC
151 TTGGAGAAAG AAAAATTAGA GAATTCCAGA TCCTTAGAAT GCAGATCAGA
201 TCCAGAATCT CCTATCAAAA AAACAAGTTT ATCTCCTACT TCTAAACTTG
251 GATACTCATA TAGTAGAGAT CTAGACCTTG CTAAGAAAA ACATGCTTCC
301 CTGAGGCAGA CGGAGTCTGA TCCAGATGCT GATAGAACCA CTTAAATCA
351 TGCAGATCAT TCATCAAAAA TAGTCCAGCA TCGATTGTTA TCTAGACAAG
401 AAGAACTTAA GGAAAGAGCA AGAGTTCTGC TTGAGCAAGC AAGAAGAGAT
451 GCAGCCTTAA AGGCAGGGAA TAAGCACAAT ACCAACACAG CCACCCATT
501 CTGCAACAGG CAGCTAAGTG ATCAGCAAGA TGAAGAGCGA CGTCGGCAGC
551 TGAGAGAGAG AGCTCGTCAG CTAATAGCAG AAGCTCGATC TGGAGTGAAG
601 ATGTCAGAAC TTCCCAGCTA TGGTGAATG GCTGAGAAA AGTTGAAAGA
651 AAGGTCAAAG CAAACAGTA AGTTGGTGGA CTTGAAGCTG AAGAAGCTCC
701 TAGAAgTTCA gCCACAGGTG GCAAATTCAc CCTCCAGTGC TGCCCAGAAA
751 GCTGTAACTG AgAgCTCaGA gCaGGACATG AAAAGTGGCa CAGAAGATCT
801 CCGGACTGAA CGATTACAAA AAACAACAGA ACGTTTTAGA AATCCTGTTG

```

851 TGTCAGCAA AGATTCTACA GTCAGAAAAA CTCAACTTCA GTCTTCAGC
901 CAATATATTG AGAATAGACC AGAGATGAAA AGGCAGAGAT CAATACAGGA
951 AGATACAAAG AAAGGAAATG AGGAGAAGGC AGCGATAACT GAAACTCAGA
1001 GGAAGCCATC AGAAGATGAA GTGCTTAATA AAGGGTTCAA AGACACCAGT
1051 CAGTAGTAG TAGGAGAATT GGCAGCACTA GAGAATGAGC AAAAGCAAAT
1101 TGACACCCGT GCGCGCTGG TGGAGAACCG CCTTCGCTAT CTCATGGACA
1151 CAGGAAGGAA CACAGAAGAA GAAGAACGTA TGATGCAGGA ATGGTTATG
1201 TTAGTTAATA AGAAAAATGC CTTAATAAGG AGAATGAATC AGCTCTCT
1251 TCTGGAAAAA GAACATGATT TAGAACGACG GTATGAGCTG CTGAACCGGG
1301 AATTGAGGGC AATGCTAGCC ATTGAAGACT GGCAGAACGAC CGAGGCCAG
1351 AAGCGACGCG AACAGCTTCT GCTAGATGAG CTGGTGGCCC TGGTGAACAA
1401 GCGCGATGCG CTCGTCAAGGG ACCTGGACGC GCAGGAGAAG CAGGCCAG
1451 AAGAAGATGA GCATTGGAG CGAACTCTGG AGCAAAACAA AGGCAAGATG
1501 GCCAAGAAAG AGGAGAAATG TGTTCTTCAG TAGCCATCAG ATCAGAAAGA
1551 ATCTCTCCCA ACATTTAGA GTCTTGCTTC CCAAACCAGA AAAAGTCAGA
1601 CTCATTGTTG ATTTAAAATC TTTAACATTT TGTTGGCTG GATTGTACTA
1651 CTTTACCTCT ACTTTACCAAC CACCACCCCTT TTCCCTCCCTC CTTTCCAAAT
1701 AATATACAGA ACTCCAAAAT AGCTTCATTT AAGGATTTTG TTGTGAGTTA
1751 ACAATTTCCT TGAAATCCTG TGAAATAGAT TTGCACAGAC ACCTTGTGAG
1801 TGATTGGTAT TGGAGGTGTT CAAGAAACTG TTCGAAAAAG AACAAAAACA
1851 CTTCCCTCGT TATTTCTCT CATTTTTGAG TGAGAGGAAA ATTTGAAACA
1901 TTATTCTTGT TGTTGGTGGT AATAGCATAA TGACAGTGGG AGGGGTACAA
1951 GGGGATAAGA AAAATGTCA GATTTTTTC CGGTCCCTGCC ACATGTAACA
2001 CTTAcTcTGT TACCTAAATT TTATAGTTAG ATCATATCCa ATctACTTAT
2051 TAAACTGTGT TCTATTACCA AGTGGAGTT TTcTGCAGTG GtTGCCTTTC
2101 ACTGTAAGGA TAATGGAGTT CcTcTCcTCT GCTTCCTCA GAGGATGGTC
2151 CTTtAAcATA GCCAGAAACA AGCCCTGTGG TTTGAAGGTG AGCTGTGAGG
2201 ATGGGACTAA TTGATATGCA CCAGTTACA AAGACAGTcT TaTCATCCGA
2251 GAATACACCA TcTTTTTcTc TGAGATAATT TTTCTtACAT CATGCTTGAT
2301 TCCTACATTT TGTTGGTTT CAACATTGGC TCACGAATGC TGTTAATATT
2351 TATTCTGTAT tGATAAAAAG TctGTcTTGC CACTACAAGT AAATCCCCCA
2401 TTTAATATTT TcTTcTTTAG CATAGCACTG TCATTTTTG TGAAAATGGT
2451 TATGTTTATT TATTACAATA CTGAGTCATA TATAAATTTT CAATAAAAGC
2501 AGAAACTTTC TTACCTTAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 523 Aminosäuren
ART: Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS: Protein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens
STAMM: kaukasisch
ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: abgeleitet aus cDNA-Sequenz

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für das
regulatorische Protein pKe#83
aus humanen Keratinozyten

LAGE:

ERMITTlungSMETHODE: Ableitung aus cDNA-Sequenz

SONSTIGE ANGABEN:

umfaßt eine Prenyl-Gruppen-Bindungs-
stelle ("CAAX-Box"), neun Proteinkinase-
phosphorylierungsmotive, 15 Casein-
kinasephosphorylierungsmotive und zwei
Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive

SEQ ID NO: 3

1 MSPPFICEET DEQKLQTLDI GSNLEKEKLE NSRSLECRSD PESPIKKTSL
51 SPTSKLGYSY SRDLDLAKKK HASLRQTESD PDADRTTLNH ADHSSKIVQH
101 RLLSRQEELK ERARVLLEQA RRDAALKAGN KHNTNTATPF CNRQLSDQQD
151 EERRRQLRER ARQLIAEARS GVKMSELPsy GEMAAEKLKE RSKASGDEND
201 NIEIDTNEEI PEGFVVGGGD ELTNLENDLD TPEQNSKLVD LKLKKLLEVQ
251 PQVANSPSSA AQKAVTESSE QDMKSGTEDL RTERLQKTTE RFRNPVVFSK
301 DSTVRKTQLQ SFSQYIENRP EMKRQRSIQE DTKKGNEEKA AITETQRKPS
351 EDEVLNKGFK DTSQYVVGEL AALENEQKQI DTRAALVEKR LRYLMDTGRN
401 TEEEAMMQE WFMLVNKKNA LIRRNMQLSL LEKEHDLERR YELLNRELRA
451 MLAIEDWQKT EAQKRREQLL LDELVALVNK RDALVRDLDA QEKOAEED
501 HLERTLEQNQ GKMAKKEEKC VLQ*

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:4:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 482 Aminosäuren
 ART: Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS: Protein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens
 STAMM: kaukasisch
 ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
 ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: abgeleitet aus cDNA-Sequenz

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für das
 regulatorische Protein pK#83
 aus humanen Keratinozyten

LAGE: von 1 bis 482
 ERMITTlungSMETHODE: Ableitung aus cDNA-Sequenz
 SONSTIGE ANGABEN: umfaßt eine Prenyl-Gruppen-Bindungs-
 stelle ("CAAX-Box"), neun Proteinkinase-
 phosphorylierungsmotive, 15 Casein-
 kinasephosphorylierungsmotive und zwei
 Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive

SEQ ID NO: 4

```

1  MSPPFICEET DEQKLQTLDI GSNLEKEKLE NSRSLECRSD PESPIKKTS
51  SPTSKLGYSY SRDLDLAKKK HASLRQTESD PDADRTTLNH ADHSSKIVQH
101 RLLSRQEELK ERARVLLEQA RRDAALKAGN KHNTNTATPF CNRQLSDQQD
151 EERRRQLRER ARQLIAEARS GVKMSELPsy GEMAAEKLKE EQNSKLVDLK
201 LKKLLEVQPQ VANSPSSAAQ KAVTESSEQD MKSGTEDLRT ERLQKTTERF
251 RNPVVFSKDS TVRKTLQSF SQYIENRPEM KRQRSIQEDT KKGNEEKAAI
301 TETQRKPSED EVLNKGFKDT SQYVVGELAA LENEQKQIDT RAALVEKRLR
351 YLMDTGRNTE EEEAMMQEWF MLVNKKNALI RRMNQLSLLE KEHDLERRYE
401 LLNRELRAML AIEDWQKTEA QKRREQLLLD ELVALVNKRD ALVRDLDQA
451 KQAEEDDEHL ERTLEQNKGK MAKKEEKCVL Q*

```

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 2559 Basenpaare
 ART: Desoxyribonukleinsäure
 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA

HYPOTETISCH: nein

ANTI-SENSE: nein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo Sapiens
 STAMM: kaukasisch
 ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
 ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: cDNA aus Keratinozyten

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Splice Variante einer kodierenden Sequenz für das regulatorische Protein pKe#83 aus humanen Keratinozyten

LAGE: von 1 bis 2559

ERMITTlungSMETHODE: cDNA-Sequenzierung

SEQ ID NO: 5

```

1  GTTTGTTAG GCAAAAGAG ACTATTGAAA GCTGAGACTT TAGAATTGAG
51  TGACTTATAT GTTAGTGATA AGAAGAAGGA TATGTCTCCA CCCTTTATTT
101  GTGAGGAGAC AGATGAACAA AAGCTTCAAA CTCTAGACAT CGGTAGTAAC
151  TTGGAGAAAG AAAAATTAGA GAATTCCAGA TCCTTAGAAT GCAGATCAGA
201  TCCAGAACAT CCTATCAAAA AAACAAGTTT ATCTCCTACT TCTAAACTTG
251  GATACTCATA TAGTAGAGAT CTAGACCTTG CTAAGAAAAA ACATGCTTCC
301  CTGAGGCAGA CGGAGTCTGA TCCAGATGCT GATAGAACCA CTTTAAATCA
351  TGCAGATCAT TCATCAAAA TAGTCCAGCA TCGATTGTTA TCTAGACAAG
401  AAGAACTTAA GGAAAGAGCA AGAGTTCTGC TTGAGCAAGC AAGAAGAGAT
451  GCAGCCTTAA AGGCGGGGAA TAAGCACAAT ACCAACACAG CCACCCCCATT
501  CTGCAACAGG CAGCTAAGTG ATCAGCAAGA TGAAGAGCGA CGTCGGCAGC
551  TGAGAGAGAG AGCTCGTCAG CTAATAGCAG AAGCTCGATC TGGAGTGAAG
601  ATGTCAAAAC TTCCCAGCTA TGGTGAAATG GCTGCAGAAA AGTTGAAAGA
651  AAGGTCAAAG GCATCTGGAG AACAAAACAG TAAGTTGGTG GACTTGAAAGC
701  TGAAGAAGCT CCTAGAAGTT CAGCCACAGG TGGCAAATTG ACCCTCCAGT
751  GCTGCCAGA AAGCTGTAAC TGAGAGCTCA GAGCAGGACA TGAAAAGTGG
801  CACAGAAGAT CTCCGGACTG AACGATTACA AAAAACACA GAACGTTTTA
851  GAAATCCTGT TGTGTTCAAGC AAAGATTCTA CAGTCAGAAA AACTCAACTT

```

901 CAGTCTTCAGCCAATATAT TGAGAATAGA CCAGAGATGA AAAGGCAGAG
951 ATCAATACAG GAAGATACAA AGAAAGGAAA TGAGGAGAAG GCAGCGATAA
1001 CTGAAACTCA GAGGAAGCCA TCAGAAGATG AAGTGCTAA TAAAGGGTTC
1051 AAAGACACCA GTCAGTATGT AGTAGGAGAA TTGGCAGCAC TAGAGAATGA
1101 GCAAAAGCAA ATTGACACCC GTGCCGCGCT GGTGGAGAAG CGCCTTCGCT
1151 ATCTCATGGA CACAGGAAGG AACACAGAAG AAGAAGAAC TATGATGCAG
1201 GAATGGTTA TGTTAGTTA TAAGAAAAAT GCCTTAATAA GGAGAATGAA
1251 TCAGCTCTCT TTTCTGGAAA AAGAACATGA TTTAGAACGA CGGTATGAGC
1301 TGCTGAACCG GGAATTGAGG GCAATGCTAG CCATTGAAGA CTGGCAGAAG
1351 ACCGAGGCC AGAACGACG CGAACAGCTT CTGCTAGATG AGCTGGTGGC
1401 CCTGGTGAAC AAGCGCGATG CGCTCGTCAG GGACCTGGAC GCGCAGGAGA
1451 AGCAGGCCGA AGAAGAACAT GAGCATTTGG AGCGAACTCT GGAGCAAAAC
1501 AAAGGCAAGA TGGCCAAGAA AGAGGAGAAA TGTGTTCTTC AGTAGCCATC
1551 AGATCAGAAA GAATCTCTCC CAACATTTA GAGTCTTGCT TCCCAAACCA
1601 GAAAAAGTCA GACTCATTGT TGATTTAAAAA CTTTAACAT TTTGTTGGC
1651 TGGATTGTAC TACTTTACCT CTACTTTACC ACCACCACCC TTTTCTCCC
1701 TCCTTCCAA ATAATATACA GAACTCCAAA ATAGCTTCAT TTAAGGATT
1751 TTTTGTGAGT TAACAATTTC CTTGAAATCC TGTGAAATAG ATTTGCACAG
1801 ACACCTTGTG AGTGATTGGT ATTGGAGGTG TTCAAGAAC TGTTGAAAAA
1851 AGAACAAAAA CACTCCCTC GTTATTTCT CTCATTTTT GATGAGAGGA
1901 AAATTGAAA CATTATTCTT GTTGTGTTG GTAATAGCAT AATGACAGTG
1951 GGAGGGGTAC AAGGGATAA GAAAATGTC ATGATTTTT TCCGGTCTG
2001 CCACATGTAACACTACTCT GTTACCTAAA TTTTATAGTT AGATCATATC
2051 CAATCTACTT ATTAAACTGT GTTCTATTTA CCAGTGGAGT TTTTCTGCAG
2101 TGGTTGCGTT TCACTGTAAG GATAATGGAG TTCCCTCTCCT CTGCTTCCCT
2151 CAGAGGATGG TCCTTAAACA TAGCCAGAAA CAAGCCCTGT GGTTGAAAGG
2201 TGAGCTGTGA GGATGGGACT AATTGATATG CACCAGTTA CAAAGACAGT
2251 CTTATCATCC GAGAATACAC CATCTTTTC TCTGGATAAT TATTCTTAC
2301 ATCATGCTTG ATTCTACAT TTTGTTGGT TTCAACATTG GCTCACGAAT
2351 GCTGTTAATA TTTATTCTGT ATTGATAAAA AGTCTGTCTT GCCACTACAA
2401 GTAAATCCCC CATTAAATAT TTTCTCTTT AGCATAGCAC TGTCAATTTT
2451 TGTGAAAATG GTTATGTTA TTTATTACAA TACTGAGTCA TATATAAATT
2501 TTCAATAAAA GCAGAAACTT TCTTACCTA AAAAAAAA AAAAAAAA
2551 AAAAAAAA

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 487 Aminosäuren
 ART: Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS: Protein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo Sapiens
 STAMM: kaukasisch
 ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
 ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: abgeleitet aus cDNA-Sequenz

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für regulatorisches Protein pKe#83 aus humanen Keratinozyten

LAGE:

von 1 bis 487

ERMITTlungSMETHODE: abgeleitet aus cDNA-Sequenz

SONSTIGE ANGABEN umfaßt eine Prenyl-Gruppen-Bindungsstelle ("CAAX-Box"), acht Proteinkinase-phosphorylierungsmotive, 12 Casein-kinasephosphorylierungsmotive und zwei Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive

SEQ ID NO: 6

```

1  MSPPFICEET DEQKLQTL DI GSNLEKEKLE NSRSLECRSD PESPIKKTS L
51  SPTSKLGYSY SRDL DLLAKKK HASLRQTESD PDADRTTLNH ADHSSKIVQH
101 RLLSRQEELK ERARVILLEQA RRDAAALKAGN KHNTNTATPF CNRQLSDQQD
151 EERRRQLRER ARQLIAEARS GVKMSELP SY GEMAAEKLKE RSKASGEQNS
201 KLVDLKLKKL LEVQPQVANS PSSAAQKAVT ESSEQDMKSG TEDLRTERLQ
251 KTTERFRNPV VFSKDSTVRK TQLQSFSQYI ENRPEMKRQR SIQEDTKKGN
301 EEKAAAITETQ RKPS EDEVLN KGFKDTSQYV VGE LAAL ENE QKQIDTRAAL
351 VEKRLRYLMD TGRNTEEEE A MMQEWFMLVN KKNALIRR MN QLSLLEKEHD
401 LERRYELLNR ELRAMLAIED WQKTEAQKRR EQLLLDELVA LVNKRDALVR
451 DLDAQE KQAE E EDEHLERTL EQNKGKMAKK EEKCVLQ*

```

ANGABEN ZU SEQ ID NO 7:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 4911 Basenpaare
 ART: Desoxyribonukleinsäure
 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA

HYPOTHETISCH: nein

ANTI-SENSE: nein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens
 STAMM: kaukasisch
 ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
 ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: cDNA aus Keratinozyten

MERKMALE:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für
 regulatorisches Protein pKe#83
 aus humanen Keratinozyten

LAGE: von 1 bis 4911

ERMITTlungSMETHODE: cDNA-Sequenzierung

SEQ ID NO 7:

```

1  GGCGGGGGAG  CCCTCCAGAA  TACCCATCAT  ATAGCCCCTG  AGGTGGCATG
51  GTGATGTCTC  CATGAGGGAA  CCCCTTCCCA  CTTCATACTG  TCACGTATAT
101  CATAGTGTTC  TTGACTGGGC  CATTCACTCA  AGATGGGATT  TACCCCTGTGA
151  AACAGGGAGA  AGACTTATGG  ACCCCAAGCA  TCATTTCAAG  TTGAAGTTGA
201  GTTTTTAAAAA  GCCATCCATG  CAAAGTTCCCT  TTGCTTTGGA  CCCTCTGCAT
251  TATTAAGCT  GCTGTATTGC  TAACCCAGAA  CTGCTCCAGT  GTCTTGACTG
301  ATCATCATGG  CTTCAAGTTG  GAAGAGACTG  CAGCGTGTGG  GAAAACATGC
351  ATCCAAGTTC  CAGTTGTGG  CCTCCTACCA  GGAGCTCATG  GTTGAGTGT
401  CGAAGAAATG  GTAACCAGAT  AAACTGGTGG  TAGTTTGGAC  CAGAAGAAC
451  CGAAGGAAGT  CTTCTAAGGC  ACATAGCTGG  CAACCTGGAA  TAAAAAAATCC
501  CTATCGTGGT  GTTGTGTGT  GGCCTGTTCC  TGAAAACATT  GAAATCACTG
551  TAACACTTT  TAAGGGATCCT  CATGCGGAAG  AATTGAAAGA  CAAAGAGTGG
601  ACATTTGTCA  TAGAAAATGA  ATCCCCTTCT  GGTCGAAGGA  AAGCTCTTGC
651  TACTAGCAGC  ATCAATATGA  AACAGTATGC  AAGCCCTATG  CCAACTCAGA
701  CTGATGTCAA  GTTAAAATTC  AAGCCATTAT  CTAAAAAAAGT  TGTATCTGCC
751  GCTCTTCAGT  TTTCATTATC  TTGCATTTTT  CTGAGGGAAAG  GAAAAGCCAC
801  AGATGAAGAC  ATGCAAAGTT  TGGCTAGTTT  GGTGAGTATG  AAGCAGGCTG
851  ACATTGGCAA  TTTAGATGAC  TTCGAAGAAG  ATAATGAAGA  TGATGATGAG

```

901 AACAGAGTGA ACCAAGAAGA AAAGGCAGCT AAAATTACAG AGCTTATCAA
 951 CAAACTAAC TTTTGGATG AAGCAGAAAA GGACTTGGCC ACCGTGAATT
 1001 CAAATCCATT TGATGATCCT GATGCTGCAG AATTAAATCC ATTTGGAGAT
 1051 CCTGACTCAG AAGAACCTAT CACTGAAACA GCTTCACCTA GAAAAACAGA
 1101 AGACTCTTT TATAATAACA GCTATAATCC CTTAAAGAG GTGCAGACTC
 1151 CACAGTATTG GAACCCATTC GATGAGCCAG AAGCATTGT GACCATAAAG
 1201 GATTCTCCTC CCCAGTCTAC AAAAAGAAAA AATATAAGAC CTGTGGATAT
 1251 GAGCAAGTAC CTCTATGCTG ATAGTTCTAA AACTGAAGAA GAAGAATTGG
 1301 ATGAATCAAA TCCTTTTAT GAACCTAAAT CAACTCCTCC TCCAAATAAT
 1351 TTGGTAAATC CTGTTCAAGA ACTAGAAACT GAAAGGCGAG TGAAAAGAAA
 1401 GGCCCCGGCT CCACCAAGTCC TCTCACCAAA AACAGGAGTA TTAAATGAAA
 1451 ACACAGTTTC TGCAGGAAAA GATCTCTCTA CTTCTCCTAA GCCAAGCCCT
 1501 ATACCAAGTC CTGTTTGGG GCGAAAGCCA AATGCTAGTC AGTCTTGCT
 1551 TGTATGGTGT AAAGAAGTTA CAAAGAACTA CCGAGGAGTA AAAATCACCA
 1601 ATTTTACTAC ATCGTGGAGA AATGGTTTAT CTTTTGTGC AATATTACAC
 1651 CACTTTAGAC CAGATTAAAT TGACTACAAG TCTCTGAATC CTCAAGATAT
 1701 TAAAGAGAAC AACAAAAAGG CATACTGATGG ATTTGCCAGC ATAGGAATT
 1751 CCCGATTATT GGAACCTCT GATATGGTAT TATTAGCAAT TCCTGATAAA
 1801 CTGACTGTTA TGACTTATCT CTATCAAATA AGGGCACATT TCAGTGGCCA
 1851 AGAACTAAAT GTCGTTAGA TAGAGGAAAA CAGCAGTAAA AGCACATATA
 1901 AAGTTGGAAA CTATGAAACA GATACAAACA GTTCTGTTGA TCAAGAAAAA
 1951 TTCTATGCAG AGCTTAGTGA TCTGAAGCGG GAGCCTGAAC TACAACAGCC
 2001 TATCAGCGGA GCAGTAGACT TCTTATCACA GGATGACTCT GTATTTGAA
 2051 ATGATAGCGG GGTTGGAGAG TCAGAAAGTG AGCATCAAAC TCCTGATGAT
 2101 CACCTTAGTC CAAGCACAGC CTCCCCTTAC TGTGCAGGA CTAAAAGTGA
 2151 CACAGAACCC CAGAAGTCTC AGCAGAGCTC TGGAAGGACT TCAGGATCTG
 2201 ATGACCCTGG AATATGTTCC AATACAGATT CAACCCAAGC ACAGGTTTG
 2251 TTAGGCAAAA AGAGACTATT GAAAGCTGAG ACTTTAGAAT TGAGTGACTT
 2301 ATATGTTAGT GATAAGAAGA AGGATATGTC TCCACCCCTT ATTTGTGAGG
 2351 AGACAGATGA ACAAAAGCTT CAAACTCTAG ACATCGGTAG TAACTGGAG
 2401 AAAGAAAAAT TAGAGAATTG CAGATCCTTA GAATGCAGAT CAGATCCAGA
 2451 ATCTCCTATC AAAAAAACAA GTTATCTCC TACTTCTAA CTTGGATACT
 2501 CATATAGTAG AGATCTAGAC CTTGCTAAGA AAAAACATGC TTCCCTGAGG
 2551 CAGACGGAGT CTGATCCAGA TGCTGATAGA ACCACTTAA ATCATGCAGA
 2601 TCATTTCATCA AAAATAGTCC AGCATCGATT GTTATCTAGA CAAGAAGAAC
 2651 TTAAGGAAAG AGCAAGAGTT CTGCTTGAGC AAGCAAGAAC AGATGCAGCC
 2701 TAAAGGCAGG GGAATAAGCA CAATACCAAC ACAGGCCACCC CATTCTGCAA
 2751 CAGGCAGCTA AGTGTATCAGC AAGATGAAGA GCGACGTCGG CAGCTGAGAG
 2801 AGAGAGCTCG TCAGCTAATA GCAGAACGCTC GATCTGGAGT GAAGATGTCA
 2851 GAACTTCCC A GCTATGGTGA AATGGCTGCA GAAAAGTTGA AAGAAAGGTC
 2901 AAAGGCATCT GGAGATGAAA ATGATAATAT TGAGATAGAT ACTAACGAGG
 2951 AGATCCCTGA AGGCTTGTGTT GTAGGAGGTG GAGATGAACT TACTAACCTA
 3001 GAAAATGACC TTGATACTCC CGAACAAAAG AGTAAGTTGG TGGACTTGAA
 3051 GCTGAAGAAG CTCCTAGAAG TTCAGCCACA GGTGGCAAAT TCACCCCTCCA
 3101 GTGCTGCCCA GAAAGCTGTA ACTGAGAGCT CAGAGCAGGA CATGAAAAGT
 3151 GGCACAGAAG ATCTCCGGAC TGAACGATTA CAAAAAACAA CAGAACGTTT
 3201 TAGAAATCCT GTTGTGTTCA GCAAAGATTG TACAGTCAGA AAAACTCAAC
 3251 TTCAGTCTTT CAGCCAATAT ATTGAGAATA GACCAGAGAT GAAAAGGCAG
 3301 AGATCAATAC AGGAAGATAC AAAGAAAGGA AATGAGGAGA AGGCAGCGAT
 3351 AACTGAAACT CAGAGGAAGC CATCAGAAGA TGAAGTGCTT AATAAAGGGT
 3401 TCAAAGACAC CAGTCAGTAT GTAGTAGGAG AATTGGCAGC ACTAGAGAAT
 3451 GAGCAAAAGC AAATTGACAC CGGTGCCCGCG CTGGTGGAGA AGCGCCTTCG

3501 CTATCTCATG GACACAGGAA GGAACACAGA AGAAGAAGAA GCTATGATGC
3551 AGGAATGGTT TATGTTAGTT AATAAGAAAA ATGCCTTAAT AAGGAGAATG
3601 AATCAGCTCT CTCTTCTGGA AAAAGAACAT GATTAGAAC GACGGTATGA
3651 GCTGCTGAAC CGGGAATTGA GGGCAATGCT AGCCATTGAA GACTGGCAGA
3701 AGACCGAGGC CCAGAACGCA CGCGAACAGC TTCTGCTAGA TGAGCTGGTG
3751 GCCCTGGTGA ACAAGCGCGA TGCGCTCGTC AGGGACCTGG ACGCGCAGGA
3801 GAAGCAGGCC GAAGAAGAAG ATGAGCATT GGAGCGAACT CTGGAGCAAA
3851 ACAAAAGGCAA GATGGCCAAG AAAGAGGAGA AATGTGTTCT TCAGTAGCCA
3901 TCAGATCAGA AAGAACATCT CCCAACATT TAGAGTCTTG CTTCCCAAAC
3951 CAGAAAAAGT CAGACTCATT GTTGATTAA AACTTTAAC ATTTTGTGTTG
4001 GCTGGATTGT ACTACTTAC CTCTACTTTA CCACCAAC CCTTTCTC
4051 CCTCCTTCC AAATAATATA CAGAACTCCA AAATAGCTTC ATTTAAGGAT
4101 TTTTTGTGA GTTAACAATT TCCTGAAAT CCTGTGAAAT AGATTCGCAC
4151 AGACACCTTG TGAGTGATTG GTATTGGAGG TGTTCAAGAA ACTGTTCGAA
4201 AAAGAACAAA AACACTTCCC TCGTTATTT CTCTCATTT TTGATGAGAG
4251 GAAAATTGAA AACATTATTC TTGTTGTTGT TGGTAATAGC ATAATGACAG
4301 TGGGAGGGGT ACAAGGGGAT AAGAAAAATG TCATGATTTC TTTCGGTCC
4351 TGCCACATGT AACACTTACT CTGTTACCTA AATTATAG TTAGATCATA
4401 TCCAATCTAC TTATTAAACT GTGTTCTATT TACCAAGTGGA GTTTTCTGC
4451 AGTGGTTGCG TTTCACTGTA AGGATAATGG AGTTCCCTCTC CTCTGTTTC
4501 CTCAGAGGAT GGTCCCTTAA CATAGCCAGA AACAGCCCT GTGGTTGAA
4551 GGTGAGCTGT GAGGATGGGA CTAATTGATA TGCACCAGTT TACAAAGACA
4601 GTCTTATCAT CCGAGAACAC ACCATCTTT TCTCTGGATA ATTATTTCTT
4651 ACATCATGCT TGATTCCCTAC ATTTGTTGG GTTCAACAT TGGCTCACGA
4701 ATGCTGTTAA TATTTATTCT GTATTGATAA AAAGTCTGTC TTGCCACTAC
4751 AAGTAAATCC CCCATTAAAT ATTTCTTCT TTAGCATAGC ACTGTCATTT
4801 TTTGTGAAAA TGGTTATGTT TATTTATTAC AATACTGAGT CATATATAAA
4851 TTTCAATAA AAGCAGAAC TTTCTTACCT TAAAAAAA AAAAAAAA
4901 AAAAAAAA A*

(END)

ANGABEN ZU SEQ ID-NO 8:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1076 Aminosäuren
 ART: Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS: Protein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens
 STAMM: kaukasisch
 ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
 ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: abgeleitet aus cDNA-Sequenz

MERKMALE:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für das
 regulatorische Protein pKe#83
 aus humanen Keratinozyten
 von 1 bis 1076

LAGE:

ERMITTlungSMETHODE: Ableitung aus cDNA-Sequenz
 SONSTIGE ANGABEN: umfaßt eine Prenyl-Gruppen-Bindungs-
 stelle ("CAAX-Box"), 24 Proteinkinase-
 phosphorylierungsmotive, 29 Casein-
 kinasephosphorylierungsmotive 5
 Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive
 und 8 Myrsitylierungsstellen

SEQ ID-NO. 8:

1 MKQYASPMPT QTDVKLKFKP LSKKVVSAAL QFSLSCIFLR EGKATDEDMQ
 51 SLASLVSMKQ ADIGNLDDFE EDNEDDDENR VNQEEKAASI TELINKLNFL
 101 DEAEKDLATV NSNPFDPPDA AELNPFGDPD SEEPITETAS PRKTEDSFYN
 151 NSYNPFKEVQ TPQYLNPFDE PEAFTIKDS PPQSTKRKNI RPVDMSKYLY
 201 ADSSKTEEEE LDESNPFYEP KSTPPPNNLV NPVQELETER RVKRKAPAPP
 251 VLSPKTVLNL ENTVSAGKDL STSPKPSPPIP SPVLGRKPNA SQSLLVWCKE
 301 VTKNYRGVKI TNFTTSWRNG LSFCAILHHF RPDLIDYKSL NPQDIKENNK
 351 KAYDGFASIG ISRLLEPSDM VLLAIPDKLT VMTYLYQIRA HFSGQELNVV
 401 QIEENSSKST YKVGNYETDT NSSVDQEKFY AELSDLKREP ELQQPISGAV
 451 DFLSQDDDSVF VNDSGVGESE SEHQTPDDHL SPSTASPYCR RTKSDTEPQK
 501 SQQSSGRTSG SDDPGICSNT DSTQAQVLLG KKRLLKAETL ELSDLYVSDK
 551 KKDMSPPFIC EETDEQKLQT LDIGSNLEKE KLENSRSLEC RSDPESPIKK
 601 TSLSPTSKLG YSYSRDLDA KKKHASLRQT ESDPDADRTT LNHADHSSKI
 651 VQHRLLSRQE ELKERARVLL EQARRDAALK AGNKHNTNTA TPFCNRQLSD
 701 QQDEERRRQL RERARQLIAE ARSGVKMSEL PSYGEMAAEK LKERSKASGD
 751 ENDNIEIDTN EEIPEGFVVG GGDELTNLEN DLDTPEQNSK LVDLKLKLL
 801 EVQPQVANSP SSAAQKAVTE SSEQDMKSGT EDLRTERLQK TTERFRNPVV
 851 FSKDSTVRKT QLQSFSQYIE NRPEMKRQRS IQEDTKKGNE EKAAITETQR
 901 KPSEDEVLNK GFKDTSQYVV GELAALENEQ KQIDTRAALV EKRLRYLMDT
 951 GRNTEEEAM MQEWFMVLVNK KNALIRRNMQ LSLLEKEHDL ERRYELLNRE
 1001 LRAMLAIEDW QKTEAQKRRE QLLLDELVAL VNKRDALVRD LDAQEKAQEE
 1051 EDEHLERTLE QNKGKMAKKE EKCVLQ*